

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



EVALUACIÓN DE PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA OPTIMIZAR LA
PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A TRAVÉS DE UN REACTOR DE FLUJO
ASCENDENTE

PRESENTA:

QFB ALEJANDRA ANGÉLICA CASANOVA MINA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAestría EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA
AMBIENTAL

DICIEMBRE DE 2021.

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas
División de Estudios de Posgrado



Evaluación de parámetros analíticos para optimizar la producción de hidrógeno a través de un reactor de flujo ascendente

Presenta:

QFB Alejandra Angélica Casanova Mina

Como requisito para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias con Orientación en Química Analítica Ambiental

Diciembre de 2021.



Evaluación de parámetros analíticos para optimizar la producción de hidrógeno a través de un reactor de flujo ascendente

Aprobación de tesis:

Dr. Juan Manuel Alfaro Barbosa
Presidente

Dr. José Martín Rosas Castor
Secretario

Dr. Jorge Luis Guzmán Mar
Vocal

Dr. Karim Acuña Askar
Suplente

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Sub-Directora de Estudios de Posgrado



Evaluación de parámetros analíticos para optimizar la producción de hidrógeno a través de un reactor de flujo ascendente

Comité tutorial:

Dr. Juan Manuel Alfaro Barbosa
Director de tesis

Dr. Arquímedes Cruz López
Co-Director Externo

Dra. Adriana Karina Leura Vicencio
Co-Directora Interna

Dr. Jorge Luis Guzmán Mar
Tutor 1

Dr. José Martín Rosas Castor
Tutor 2

Dr. Karim Acuña Askar
Tutor 3

RESUMEN

QFB ALEJANDRA ANGÉLICA CASANOVA MINA

Fecha de Graduación: Diciembre, 2021.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMOMA DE NUEVO LEÓN

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: Evaluación de parámetros analíticos para optimizar la producción de hidrógeno a través de un reactor de flujo ascendente

Número de páginas: 113

Candidata para el grado de Maestra en Ciencias con Orientación en Química Analítica Ambiental

Área de estudio: Química Analítica Ambiental

Propósito y método del estudio:

En el presente trabajo de investigación se utilizaron tres sustratos para la producción de hidrógeno por medio de la fermentación oscura, teniendo para ello i) agua residual de la industria de panificación (HS), ii) suero de queso (SS) y iii) lodo primario (HL) En la cual por medio de la caracterización fisicoquímica previa (pH, CT, NT, DQO, ST, STV, SST) se optó como fuente de carbohidratos el HS y como fuente de nitrógeno el SS y HL. Permitiendo evaluar dos tipos de co-digestión, HS-SS y HS-HL. Llevándose a cabo en un sistema tipo lote (en botellas serológicas, 90 mL como volumen de trabajo) a través diseño un factorial 2^2 para evaluar las variables como las dos co-digestiones y las relaciones C/N 20, 30 y 40, teniendo como inóculo lodo granular, disolución de minerales como nutrientes, temperatura controlada a 35 °C, velocidad de agitación de 50 RPM y un pH inicial 6.0 ± 0.1 durante 48 h, siendo esta la primera fase.

Se prosiguió a evaluar a cierto tiempo establecido los parámetros fisicoquímicos como pH, CT, DQO, NT, ST, SVT, SST, además la cuantificación de hidrógeno y de los AGV's de los cuales se llevó a cabo previamente el desempeño de método analítico (linealidad, precisión e incertidumbre) que brinda un mayor apoyo en la toma de decisiones. Donde la co-digestión HS-SS presentó un mayor rendimiento (0.0043 ± 0.0004 mL H₂ gSTV⁻¹ removido) comparado con la co-

digestión HS-HL y además presentó una correlación superior a 0.90 con el modelo cinético de Gompertz.

Siendo base para la producción de hidrógeno de modo continuo en la parte del escalado la co-digestión HS-SS, para poner en marcha dos tipos de reactores. Un reactor anaerobio de flujo ascendente (RAFA) y en un segundo reactor denominado reactor híbrido de flujo ascendente (RAFHA), evaluando tres TRH (3, 8 y 12 h) con la relación C/N 30, a 35 °C y $\text{pH}_{\text{inicial}} = 6.0 \pm 0.1$.

A partir de la descripción general presentada anteriormente y la justificación se establece la hipótesis, el objetivo general del trabajo y los objetivos específicos (**Capítulo I**). En el **Capítulo II** se pone en contexto la producción de hidrógeno vía fermentación oscura, como antecedentes se abordan estudios sobresalientes de investigaciones trabajando con distintos sustratos, condiciones para la fermentación oscura y la importancia de emplear co-digestiones como alternativa tecnológica y el correspondiente análisis crítico de la literatura. En el **Capítulo III** se presentan las metodologías experimentales (pH, T, DQO, Carbohidratos totales (CT), Nitrógeno Total (NT), Sólidos Totales (ST), Sólidos Totales Volátiles (STV), Sólidos Suspendidos Totales (SST) que permiten establecer los parámetros analíticos para optimizar la producción de hidrógeno a escala micro reactor, al comparar dos co-digestiones (agua residual de la industria de panificación (HS)-suero de queso (SS) y HS-lodo de una planta de tratamiento de agua residual (HL)), empleando las relaciones C/N (20, 30 y 40) y lodo granular como inóculo. Se evaluarán los parámetros de desempeño del método analítico para la cuantificación de los gases permanentes como el hidrógeno y los Ácidos Grasos Volátiles (AGV's) y la incertidumbre de las etapas de medición de hidrógeno durante la fermentación oscura. En la **Capítulo IV** se presentan los resultados del diseño de experimentos (2^2) para identificar los parámetros analíticos de mayor significancia en la fermentación oscura. En paralelo se realizó la caracterización fisicoquímica de los sustratos individuales y en co-digestión durante la fermentación oscura en un micro reactor batch, el análisis de biogás, los ácidos grasos volátiles por cromatografía de gases y el modelo cinético de Gompertz. Los resultados de este trabajo exploratorio reportaron las siguientes productividades: 0.010 mL $\text{H}_2 \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ (C/N 20), 0.0086 mL $\text{H}_2 \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ (C/N 30) y 0.0084 mL $\text{H}_2 \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ (C/N 40) para la co-digestión HS-SS, para la co-digestión HS-HL 0.0023 mL $\text{H}_2 \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ (C/N 20), 0.0022 mL $\text{H}_2 \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ (C/N 30), 0.0039 mL $\text{H}_2 \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ (C/N 40). A partir de lo anterior se implementó la co-digestión más exitosa en la producción de hidrógeno (HS-SS), con $\text{pH} = 5.5$ constante, relación C/N=30 como parámetros analíticos para operar el reactor híbrido de flujo ascendente

a TRH de 3, 8 y 12 h. Los resultados indican productividad del hidrógeno $2.3856 \text{ mL H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. En el **Capítulo V** se presentan las curvas de calibración para la evaluación de los parámetros de desempeño analítico como la linealidad, veracidad, precisión y el desarrollo de la incertidumbre a través de un diagrama de Ishikawa para representar las fuentes variables y además se presenta el desarrollo de cálculos para la concentración del hidrógeno. Finalmente, el **Capítulo VI** se describe las conclusiones de este trabajo.


Contribuciones y Conclusiones:

Los resultados obtenidos en este nivel en modo continuo con 30 ciclos y un TRH 8 h (un ciclo corresponde al TRH) fueron más favorables para el reactor RAFHA con la notable diferencia hacia una mayor producción de biogás. Carbohidratos $69\% \pm 8\%$, DQO de $56\% \pm 7\%$, los sólidos totales $55\% \pm 10\%$, sólidos totales volátiles $60\% \pm 11\%$ y la producción de biogás de 5677 mL (30 ciclos) con un máximo porcentaje promedio de hidrógeno en biogás de 40% para RAFHA y carbohidratos $76\% \pm 8\%$, DQO de $50\% \pm 7\%$, los sólidos totales $60\% \pm 4\%$, sólidos totales volátiles $63\% \pm 4\%$ y la producción de biogás de 840 mL (30 ciclos) con un máximo porcentaje promedio de hidrógeno en biogás de 43% para RAFHA.

El reactor RAFHA presentó un rendimiento de $261.72 \text{ mL gSTV}^{-1}_{\text{removido}}$, para el ciclo 27, para el TRH 12 h de $71.19 \text{ mL gSTV}^{-1}_{\text{removido}}$, para el ciclo 29 y para el TRH 3 h de $62.80 \text{ mL gSTV}^{-1}_{\text{removido}}$, siendo más alto para el TRH 8 h. También cabe destacar que siguió operando hasta el ciclo 50, donde el TRH 3 y 12 h se inactivó al ciclo 30.



QFB Alejandra Angélica Casanova Mina



Dr. Juan Manuela Alfaro Barbosa

DEDICATORIAS

A mi madre por siempre estar en todo momento con su apoyo incondicional y por creer en mí, sin sus sacrificios no hubiese llegado hasta aquí; persona que me motivó a alcanzar mis anhelos, lo cual siempre estaré agradecida por todo esto.

A mi hermano por cuidarme desde niña y seguir creyendo en mis metas, por su apoyo del cual también estoy muy agradecida.

A mis amigos desde la infancia, así como los que he ido conociendo en este camino de la vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a través de las becas nacionales, otorgándome la beca No. 737071, el cual permitió la realización de este proyecto de investigación.

Al Dr. Arquímedes Cruz López por darme la oportunidad de integrarme al mundo de la investigación científica para el bien de la sociedad, por sus valiosas enseñanzas en cada aspecto que fue requerido para este proyecto, por su paciencia.

Al Dr. Juan Manuel Alfaro Barbosa por su apoyo en llevar a cabo esta investigación, así como guía para este trayecto encaminado a la investigación.

A los doctores por su apoyo y asesoramiento en este trayecto de enseñanza.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como las facultades de la UANL como la Facultad de Ingeniería Civil, Facultad de Medicina, a la Facultad Autónoma Agraria Antonio Narro.

RECONOCIMIENTOS

El presente estudio se realizó dentro del marco del proyecto con clave No. 249908 apoyado por el FONDO SECTORIAL CONACYT-SENER-SUSTENTABILIDAD ENERGÉTICA a través del proyecto “Diseño, desarrollo y operación de un reactor biológico para la generación de hidrógeno a partir del tratamiento de aguas residuales de tipo sanitario de origen doméstico, público e industrial” y al proyecto PAICYT UANL 2021 con clave CE1762-21.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
DEDICATORIAS	iv
RECONOCIMIENTOS	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABLAS	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
CAPÍTULO I	6
INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Introducción.....	7
1.2 Antecedentes	11
1.2.1 Residuos de alimentos	11
1.2.2 Co-digestiones utilizadas en la FO.....	12
1.2.3 Análisis crítico de la literatura.....	14
1.3 Aportación científica	16
1.4 Hipótesis	16
1.5 Objetivo general.....	16
1.6 Objetivos específicos.....	16
CAPÍTULO II	18
MARCO TEÓRICO	18
2.1 Marco teórico.....	19
2.1.1 Contexto energético y las energías renovables en México.....	19
2.1.2 El hidrógeno como recurso energético	20
2.1.3 Producción de hidrógeno a partir de procesos biológicos.....	21
2.1.4 Fermentación oscura	22
Especies productoras de hidrógeno.....	24
2.1.5 Rendimiento y tasa de producción de hidrógeno.....	27
2.1.6 Factores que establecen la producción de hidrógeno	27

2.1.7 Reactores biológicos	30
Reactor anaerobio de flujo ascendente	30
Reactor anaerobio híbrido de flujo ascendente	31
CAPÍTULO III	32
MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1 Diagrama general de la metodología experimental.....	33
3.2 Sustratos para las co-digestiones e inóculo	34
3.3 Caracterización fisicoquímica de los sustratos.....	35
Potencial de Hidrógeno (pH).....	35
Carbohidratos Totales (CT)	35
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	36
Nitrógeno Total (NT)	37
Sólidos Totales, Sólidos Totales Volátiles y Sólidos Suspendidos Totales.....	37
3.4 Fermentación oscura en sistema tipo lote.....	39
3.4.1 Diseño de experimentos para las co-digestiones en el sistema tipo lote	39
3.4.2 Preparación del sistema para el proceso de fermentación oscura en el sistema de reactores tipo lote	39
3.5 Monitoreo del biogás y análisis por cromatografía de gases.....	41
3.5.1 Análisis de biogás.....	41
3.5.2 Análisis por cromatografía de gases	41
3.6 Cinética del proceso de producción de hidrógeno	43
3.6.1 Modelo Gompertz modificado.....	43
3.7 Escalamiento de la co-digestión.....	44
3.7.1 Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente (RAFA).....	44
3.7.2 Reactor Anaerobio Híbrido de Flujo Ascendente (RAHFA)	45
3.8 Rendimiento y tasa de producción volumétrica del hidrógeno	46
3.9 Evaluación de los parámetros de desempeño del método analítico para la cuantificación de hidrógeno y ácidos grasos volátiles	48
3.9.1 Medición de hidrógeno y ácidos grasos volátiles.....	49
3.10 Incertidumbre	51
3.10.1 Desarrollo y cálculo de la incertidumbre	52
.....	53

CAPÍTULO IV	54
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
4.1 Resultados y discusión	55
4.2 Caracterización fisicoquímica de los sustratos.....	56
4.3 Caracterización de mono-digestiones y co-digestiones HS-SS y HS-HL en el sistema tipo lote	58
Medición de potencial de hidrógeno (pH)	58
Producción de biogás.....	60
Demanda Química de Oxígeno, Carbohidratos totales, Sólidos (totales, volátiles y suspendidos volátiles).....	62
Producción de hidrógeno.....	64
Producción de metabolitos secundarios (AGV's).....	65
4.4 Modelo cinético de Gompertz modificado	55
Co-digestión HS-SS	55
Co-digestión HS-HL.....	56
4.5 Rendimiento y tasa de producción acumulada de hidrógeno	58
Co-digestión HS-SS	58
Co-digestión HS-HL.....	59
4.6 Análisis estadístico	60
4.7 Escalado de la co-digestión anaerobia.....	61
4.7.1 Resumen de reactores híbridos de flujo ascendente sin platos y con platos	61
4.7.2 Reactor anaerobio híbrido de flujo ascendente operando a TRH 3, 8 y 12 h	62
Medición de potencial de hidrógeno (pH)	62
Producción de biogás.....	64
Producción de hidrógeno.....	65
Remoción de carbohidratos.....	66
Remoción de DQO.....	68
Remoción de ST, STV y SST.....	69
Metabolitos secundarios en la FO.....	70
4.7.3 Rendimiento del hidrógeno	72
4.7.4 RAHFA con TRH 8 h durante 50 ciclos.....	74
CAPÍTULO V	89

EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E INCERTIDUMBRE	89
5.1 Evaluación de parámetros de desempeño del método analítico por cromatografía de gases e incertidumbre	90
5.2 Cuantificación de gases permanentes, hidrógeno	91
5.3 Cuantificación de AGV's	92
5.4 Incertidumbre	95
CAPÍTULO VI	90
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	90
6.1 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	97
Referencias	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción biológica de hidrógeno como fuente renovable de energía [8, 13].....	21
Figura 2. Rutas metabólicas para la producción de H ₂ a través de la fermentación oscura. Imagen adaptada de [23].	23
Figura 3. Torre redox. Imagen tomada del libro Brock [29].....	26
Figura 4. Representación de un reactor anaerobio de manto de lodo de flujo ascendente (UASB). Tomado del manual de agua potable de CONAGUA [40].	31
Figura 5. Descripción general de la metodología experimental desarrollada durante la investigación.	33
Figura 6. Pretratamiento térmico para el inóculo empleado durante las reacciones de fermentación oscura en un reactor en lote o en reactor anaerobio de flujo ascendente.....	34
Figura 7. Prueba de medición de pH para las diferentes muestras de mono-digestión o co-digestión en reactor en lote o en un reactor anaerobio de flujo ascendente.	35
Figura 8. Prueba de carbohidratos totales para las diferentes muestras de mono-digestión o co-digestión en reactor en lote o en un reactor anaerobio de flujo ascendente.	36
Figura 9. Prueba de Demanda Química de Oxígeno para las diferentes muestras de mono-digestión o co-digestión en reactor en lote o en un reactor anaerobio de flujo ascendente.....	36
Figura 10. Prueba de nitrógeno total para las diferentes muestras de mono-digestión o co-digestión en reactor en lote o en un reactor anaerobio de flujo ascendente.	37
Figura 11. Prueba de sólidos totales para las diferentes muestras de mono-digestión o co-digestión en reactor en lote o en un reactor anaerobio de flujo ascendente.	38
Figura 12. Representación general para la preparación de los microrreactores en el sistema tipo lote para las co-digestiones HS-SS, HS-HL y para las mono-digestiones HS, SS Y HL.	40
Figura 13. Medición de biogás por el método de desplazamiento de agua para las diferentes muestras de mono-digestión o co-digestión en reactor en lote o en un reactor anaerobio de flujo ascendente.	41
Figura 14. Cuantificación de hidrógeno, dióxido de carbono, ácidos grasos volátiles por cromatografía de gases para las diferentes muestras de mono-digestión o co-digestión en reactor en lote o en un reactor anaerobio de flujo ascendente.	42
Figura 15. Representación esquemática del reactor anaerobio de flujo ascendente de 1.2 L de volumen de trabajo operado sin platos, así también se muestra la representación de un diagrama de flujo de operación.	44
Figura 16. Representación esquemática del reactor híbrido anaerobio de flujo ascendente de 1.2 L de volumen de trabajo operado con platos, así también se muestra la representación de un diagrama de flujo de operación.	45

Figura 17. Diagrama de causa y efecto de las variables involucradas para la determinación de la incertidumbre en la cuantificación de la concentración del hidrógeno (%).	51
Figura 18. Medición de pH de la co-digestión (HS-SS) empleando tres relaciones de C/N (20, 30 y 40) y las respectivas mono-digestiones HS (C/N 72) y SS (C/N 86) empleando inóculo granular, pH= 6.00 ± 0.10, T= 35 °C, 50 RPM durante 24 h.	59
Figura 19. Medición de pH de la co-digestión (HS-HL) empleando tres relaciones de C/N (20, 30 y 40) y las respectivas mono-digestiones HS (C/N 72) y HL (C/N 1) empleando inóculo granular, pH= 6.0 ± 0.1, T= 35 °C, 50 RPM durante 24 h.	60
Figura 20. Medición de biogás de la co-digestión (HS-SS) empleando tres relaciones de C/N (20, 30 y 40) y las respectivas mono-digestiones HS (C/N 72) y SS (C/N 86) empleando inóculo granular, pH= 6.0 ± 0.1, T= 35 °C, 50 RPM durante 24 h.....	61
Figura 21. Medición de biogás de la co-digestión (HS-HL) empleando tres relaciones de C/N (20, 30 y 40) y las respectivas mono-digestiones HS (C/N 72) y HL (C/N 1) empleando inóculo granular, pH= 6.0 ± 0.1, T= 35 °C, 50 RPM durante 24 h.....	62
Figura 22. Cuantificación de hidrógeno de la co-digestión (HS-SS) empleando tres relaciones de C/N (20, 30 y 40) y las respectivas mono-digestiones HS (C/N 72) y SS (C/N 86) empleando inóculo granular, pH= 6.0 ± 0.1, T= 35 °C, 50 RPM durante 24 h.....	64
Figura 23. Cuantificación de hidrógeno de la co-digestión (HS-HL) empleando tres relaciones de C/N (20, 30 y 40) y las respectivas mono-digestiones HS (C/N 72) y HL (C/N 1) empleando inóculo granular, pH= 6.0 ± 0.1, T= 35 °C, 50 RPM durante 24 h.....	65
Figura 24. Medición de ácidos grasos volátiles de la co-digestión (HS-SS) empleando tres relaciones de C/N (20, 30 y 40) utilizando inóculo granular, pH= 6.0 ± 0.1, T= 35 °C, 50 RPM durante 24 h.	55
Figura 25. Medición de ácidos grasos volátiles de la co-digestión (HS-HL) empleando tres relaciones de C/N (20, 30 y 40) utilizando inóculo granular, pH= 6.0 ± 0.1, T= 35 °C, 50 RPM durante 24 h.	55
Figura 26. Producción acumulada de biogás para el modelo de Gompertz modificado para la co-digestión HS-SS, relación C/N 20, 30 y 40 en el sistema tipo lote.....	56
Figura 27. Producción acumulada de biogás para el modelo de Gompertz modificado para la co-digestión HS-HL, relación C/N 20, 30 y 40 en el sistema tipo lote.	57
Figura 28. Rendimiento y productividad de hidrógeno para la co-digestión HS-SS, relación C/N 20, 30 y 40 en el sistema tipo lote.	58
Figura 29. Rendimiento y productividad de hidrógeno para la co-digestión HS-HL, relación C/N 20, 30 y 40 en el sistema tipo lote.	59
Figura 30. Monitoreo de pH del efluente de los reactores bajo operación en TRH 3, 8 y 12 h...63	
Figura 31. Monitoreo del biogás acumulado de los reactores bajo operación en TRH 3, 8 y 12 h.	64

Figura 32. Porcentaje de hidrógeno en biogás en el RAHFA operado a diferentes TRH 3, 8 y 12 h.	66
Figura 33. Porcentaje de remoción de los carbohidratos y la relación C/N 30a la salida del RAHFA trabajando a diferentes TRH 3, 8 y 12 h.....	67
Figura 34. Remoción de la DQO (%) de los reactores bajo operación en TRH 3, 8 y 12 h.	68
Figura 35. Operación en TRH 3, 8 y 12 h. (A) Sólidos Totales, (B) Sólidos Volátiles Totales y (C) Sólidos Suspendidos Totales.	70
Figura 36. Producción de AGV's durante la fermentación oscura para TRH de 3, 8 y 12 h.	72
Figura 37. Rendimiento y productividad para los TRH de 3, 8 y 12 h durante 30 ciclos.....	74
Figura 38. Medición de pH y biogás acumulado (A), remoción (%) de carbohidratos (C) y remoción (%) de DQO (B) para TRH de 8 h.	75
Figura 39. Curva de calibración para el H ₂ en un rango de 5 a 30 %.....	91
Figura 40. Curva de calibración para el ácido acético con un rango de 3 a 10 mMol.....	92
Figura 41. Curva de calibración para el ácido propiónico con un rango de 3 a 10 mMol.....	93
Figura 42. Curva de calibración para el ácido fórmico con un rango de 3 a 10 mMol.....	93
Figura 43. Curva de calibración para el ácido butírico con un rango de 3 a 10 mMol.....	94
Figura 44. Curva de calibración para el ácido valérico con un rango de 3 a 10 mMol.....	94

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades del hidrógeno y otros combustibles [6].	21
Tabla 2. Diseño experimental para la evaluación en microrreactores tipo lote de las co-digestiones HS-SS y HS-HL.....	39
Tabla 3. Contenido de los tanques para la curva de calibración del hidrógeno.	49
Tabla 4. Condiciones analíticas del CG-FID para la cuantificación de hidrógeno..	49
Tabla 5. Condiciones analíticas del CG-FID para la cuantificación de hidrógeno.	50
Tabla 6. Caracterización fisicoquímica de sustratos empleados en el diseño de las co-digestiones HS-SS y HS-HL.....	56
Tabla 7. Caracterización fisicoquímica de las co-digestiones HS-SS y HS-HL para las relaciones C/N 20, 30 y 40.....	63
Tabla 8. Coeficientes de la ecuación de Gompertz modificada para la producción de biogás para la co-digestión HS-SS. Producción máxima, tasa máxima de producción de biogás y el periodo de latencia.....	55
Tabla 9. Coeficientes de la ecuación de Gompertz modificada para la producción de biogás en las tres relaciones de C/N para la co-digestión HS-HL. Producción máxima, tasa máxima de producción de biogás y el periodo de latencia.	57
Tabla 10. Datos empleados para el ANOVA de las co-digestiones HS-SS.	60
Tabla 11. Análisis de Varianza para la evaluación de las tres relaciones C/N (20, 30 y 40) en la co-digestión HS-SS.	60
Tabla 12. Resultados de parámetros fisicoquímicos para la operación de reactores RAFA y RAFHA operados a iso-condiciones de temperatura (25-35 °C, pH _{inicial} 6.0 ± 0.1).	62
Tabla 13. Valores de las incertidumbres individuales para la medición de hidrógeno.....	95

ABREVIATURAS

AGV's	Ácidos Grasos Volátiles
AR	Agua Residual
ATP	Adenosín Trifosfato
CH₄	Metano
C/N	Relación Carbono-Nitrógeno
CSTR	Reactor Continuo de Mezcla Completa (Continuous Stirred Tank Reactor)
CO₂	Dióxido de Carbono
CT	Carbohidratos Totales
DQO	Demanda Química de Oxígeno
FID	Detector de Ionización a la Flama
FO	Fermentación Oscura
HS	Agua residual de industria panificadora-Suero de queso
HL	Agua residual de industria panificadora-Lodo primario
HI	Agua residual de industria panificadora-Inóculo
LI	Lodo primario-Inóculo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida
NAD	Nicotina adenina dinucleótido en su forma oxidada
NT	Nitrógeno Total
pH	Potencial de hidrógeno
SENER	Secretaría de Energía
SI	Suero de queso-Inóculo
SS	Suero de queso
ST	Sólidos Totales
SV	Sólidos Volátiles
SST	Sólidos Suspendidos Totales
SSV	Sólidos Suspendidos Volátiles
TRH	Tiempo de Retención Hidráulica
TCD	Detector de Conductividad Térmica
UASB	Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente (Uplflow Anaerobic Sludge Blanket)

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

El uso de la energía juega un papel clave en el desarrollo económico y bienestar de una nación, sin embargo, el uso excesivo de los recursos renovables y no renovables no solo amenaza este desarrollo, sino que también afecta cuestiones como el medio ambiente y el progreso económico [1].

Para el año 2014 el consumo mundial de energía primaria representó un valor de 12,928.4 millones de toneladas equivalentes de petróleo (Mtep), basado principalmente en combustibles fósiles (petróleo, gas natural y carbón), quienes son los principales combustibles para la generación de energía primaria y proyectan un aumento de 35 % para 2025 [2], donde el Congreso mexicano ordenó que la generación de electricidad a través de estos combustibles se limite a un 65 % para 2024, a un 60 % para 2035 y a un 50 % para 2050 [3]. Desafortunadamente, la quema de estos combustibles contribuye a la emisión de los gases de efecto invernadero (GEI), tales como CO₂, CH₄, NO₂, SO₂ y otros compuestos tóxicos, quienes contribuyen a las principales causas como el calentamiento global, el cambio climático y la lluvia ácida [4]. Además de los problemas medioambientales e impactos negativos a la salud, las reservas de fósiles se están agotando y los precios son inestables. Por lo que gran parte de las economías desarrolladas tienen la necesidad de reducir esta dependencia, y tener como objetivo la búsqueda y desencadenar gradualmente un cambio hacia las energías alternativas limpias, sostenibles y renovables [4, 5].

En el caso de México, en 2014, los principales combustibles para la generación de energía primaria fueron petróleo (45 %), seguido por el gas natural (40 %) y el carbón (8 %). Mientras, en la generación de electricidad, el 57% fue generado por gas natural, el 12.9 % fue por medio de plantas hidroeléctricas, el 11.1 % empleando carbón y 8.8 % gasolinas, el resto se distribuye en 3.0 % de energía nuclear, 2 % de origen geotérmico, 1.4 % a partir de coque, 0.6% de diésel y solamente 3.0 % es de origen renovable (principalmente eólica, solar y biomasa) [1]. Por consiguiente, la generación de energía (electricidad) a partir de fuentes renovables es muy bajo y en cambio hay un aumento de la demanda de energía de 3.4 anual [6].

Hasta antes de 2018, el gobierno mexicano buscaba revertir la situación generando el 35 % de la energía a través de fuentes alternas de energía para 2024 [7]. Sin embargo, la actual administración por seguridad nacional ha decidido frenar la privatización del sector energético y

apostar por el desarrollo de una nueva refinaría de petróleo en tabasco, una termoeléctrica en el estado de Morelos a base de gas natural y la modernización de 6 refinerías, lo anterior en sinergia con el impulso de la investigación y desarrollo de mecanismos para fomentar el despliegue de este tipo de energía por medio de la investigación básica y aplicada [8, 9].

Respecto al desarrollo de energía amigable con el medio ambiente, diferentes universidades estatales y centros de investigación nacionales realizan investigaciones de suma importancia sobre la disponibilidad y formas de explotación de los georecursos disponibles (solar, eólica, geotérmica, biomasa orgánica, entre otras) [1, 10, 11]. De acuerdo con Pérez-Dencia *et al*, 2017, en el territorio mexicano hay excelentes condiciones para la generación de energía a partir de biomasa, ya sea por combustión directa o biogás [1]. El Inventario Nacional de Energías Renovables (INER), menciona que la generación potencial de biomasa en el país es de 3642 MW [12], aunque otros autores refutan lo anterior considerando que el potencial para la producción de energía sostenible es de 1713 PJ [13].

La biomasa se clasifica en combustibles de 1^{era} a la 4^{ta} generación, según el origen de la materia prima o tecnología empleada para obtenerla. De lo anterior, destacan los combustibles de 2^{da} generación cuyo origen pueden ser residuos forestales, residuos agroindustriales, residuos de alimentos y municipales [14], además de cultivos y biomasa oleaginosa incluidas las algas [15] o agua residual de tipo industrial [16]. En México se calcula el potencial lignocelulósico encontrándose en el intervalo de 183 - 495 PJ. año⁻¹ [17].

La extracción de energía de la biomasa se diversifica en tres grandes áreas que son: la combustión, los biocombustibles y la generación de biogás. Dentro de este último proceso está clasificada la Fermentación Oscura que implica la transformación biológica de la materia para obtener principalmente hidrógeno, metano y dióxido de carbono (gases permanentes).

La Fermentación Oscura (FO) es una alternativa tecnológica que promete avances importantes en la producción de hidrógeno [18] empleando residuos lignocelulósicos debido a su alto contenido de macromoléculas (lignina, celulosa y hemicelulosa), polisacáridos y azúcares simples. Sin embargo, se deben vencer ciertos retos como la hidrólisis del material lignocelulósico para generar azúcares simples fácilmente asimilables por el inóculo y conseguir la producción continua de hidrógeno en un reactor [19]. Para vencer estos desafíos técnicos y económicos, se estudian diferentes aspectos durante la operación de los reactores, parámetros

de funcionamiento fermentativa como pH, relación C/N [20], temperatura (T) [21], tiempo de retención hidráulica (TRH) [22, 23], presión parcial de hidrógeno (P°) [14, 24], hidrólisis empleando métodos físicos, químicos o enzimáticos [17, 25], el diseño de la co-digestión de las materias primas como el uso de biomasa de cáscara de frutas y lodos residuales de plantas de tratamiento de agua residual [20], la co-digestión de suero de queso crudo con residuos de frutas y verduras [26], o la co-digestión de estiércol de vaca y leche de desecho [27]. Este último punto tiene gran importancia porque las mezclas de sustratos traen múltiples beneficios a la actividad microbiana. Otro punto interesante de la FO es la posibilidad de producir hidrógeno a partir de los residuos de alimentos o agua de tipo industrial generado en cada región del planeta garantizando un desarrollo sostenible.

En el caso de la zona metropolitana de Monterrey, se enfrenta a el desafío de tratar al 100% el agua residual de tipo industrial antes de que se incorpore a los cuerpos de agua [28]. Mientras que otros productos artesanales como el suero de queso se encuentra disponible en 27 de los 32 estados del país, donde el suero es obtenido a partir de la elaboración del queso, con una generación promedio de 2.5 millones de m³ [29]. La composición principal del suero de queso dulce se representa en su mayoría por agua en un 94 % en peso, lactosa en un 4.5 % en peso, proteínas en un 0.6 % en peso, sales minerales en un 0.5 % en peso, trazas de grasa (500 mg L⁻¹) y ácido láctico (500 mg L⁻¹), es de suma importancia las proteínas seguido de la lactosa y por último las sales minerales, donde la lactosa es el que más aporta los altos valores de Demanda Bioquímica de Oxígeno; DBO (30-50 g L⁻¹) y Demanda Química de Oxígeno; DQO (60-80 g L⁻¹) a través de los desechos lácteos [30], cuyo potencial energético representa 1.27 PJ.año⁻¹ por las altas cargas orgánicas [29].

En México, un alto porcentaje de la producción de cereales es dirigido a la alimentación humana, ubicándose como segundo lugar para el mercado de la panificación en América Latina y octavo a nivel mundial, con ventas de 18 mil millones de dólares anuales, destacando empresas de panificación comerciales como Bimbo con sede en la Ciudad de México y contando con más de 45,000 panaderías denominadas “microempresas” representando el 97 % según lo indica el Instituto Nacional de Estadística y Geografía de México. Este mercado sigue experimentando crecimientos y se informa que se seguirá expandiendo con una tasa anual compuesta del 7.09 % entre 2018 y 2023 [31].

Los residuos de alimentos también son considerados un problema desde la perspectiva económica, social y medioambiental, se ha informado una producción mundial aproximadamente de 1,300 millones de residuos de alimentos al año. De los productos alimenticios con mayor desperdicio en México en el año 2017 se encuentran los productos de panadería como pan blanco con 2633.39 toneladas métricas ubicándose en tercer lugar, después de la leche y tortillas, por lo que también es de suma importancia tomar acciones con los problemas que generan los desperdicios de alimentos [32].

En la actualidad, la industria de panificación genera desechos como productos de exceso, productos deformados o productos que no son seguros para consumo residuos de masa o productos contaminados [33]. Los residuos de panadería son los más comunes y representan una fuente de grandes cantidades de nutrientes para los microorganismos para la producción de biocombustibles con un contenido de carbohidratos del 70 %, principalmente el almidón, siendo este un sustrato atractivo para la conversión hacia el hidrógeno [34, 35]. Sin embargo, en comparación con los residuos solubles, los residuos de panificación son difíciles de utilizar directamente (para el mayor aprovechamiento y mejora de la eficiencia de la conversión de nutrientes a hidrógeno estos desechos deben estar solubilizados) [35]. Es por ello que es importante el aprovechamiento de las descargas de agua residual de la industria de panificación.

Otro desecho orgánico por su alta carga orgánica y considerada como fuente estable se encuentra el lodo de plantas depuradoras [36]. El lodo es un residuo generado en una planta tratadora de agua residual (PTAR), que de igual manera es un sustrato con potencial para la producción de hidrógeno por su alto contenido orgánico y de nutrientes que se encuentra disponible a bajo o nulo costo por la creciente cantidad que se generan en las PTAR, viable para su aprovechamiento y a su vez su eliminación. Donde este tipo de sustrato ha sido ampliamente estudiado como mono-digestión y actualmente a través de las co-digestiones, entre ellos con glicerol, hojas, vinaza de vino, entre otros [37, 38]. Por lo que en este trabajo de investigación se busca trabajar la co-digestión del lodo con el agua residual de la industria de panificación.

Por lo tanto se busca el aprovechamiento de estos sustratos a través de las co-digestiones, donde la co-digestión HS-SS y HS-HL no han sido reportadas para la producción de hidrógeno y además la disminución de materia orgánica en el agua residual.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Residuos de alimentos

En la actualidad el modelo de la economía circular se ha posicionado como tema de suma importancia en la agenda política por los cruciales temas acerca del cambio climático y de la descarbonización. Por lo que sin lugar a dudas el incorporar los residuos en las cadenas de suministro y cubrir las necesidades energéticas, estas interacciones contribuyen a la gestión de dichos residuos además de promover la eficiencia entrando en el modelo circular [39, 40].

La relación entre el aumento de la población y la generación de residuos es evidente. México como país en desarrollo sigue urbanizándose y se encuentra ubicado en el decimoprimer país más poblado a nivel mundial con 126,191,000 millones de habitantes [41] y Nuevo León con 5,784,442 millones de habitantes ocupando el séptimo lugar a nivel nacional [42]. Nuevo León en extensión superficial se encuentra en el lugar 13 a nivel nacional representando el 3.3 % de la superficie del país [41]. Se estima que para dentro de 10 años Nuevo León tenga un aumento de 1 millón de personas, que es lo que se apreció en las gráficas de tasa de crecimiento, cada 10 años aumenta alrededor de 1 millón con respecto a la población. México genera 109,145,75 toneladas de residuos por día y se espera que en todo el mundo aumente hasta 3400 millones de toneladas para 2050 [42], y este cambio lo experimentará también México por lo que lo lleva a buscar formas de producción de energía a través de biocombustibles como el hidrógeno a partir de estas materias primas.

El suero como subproducto de la industria láctea representan una producción mundial de alrededor de 200 millones de toneladas por año; México ocupa el decimocuarto lugar a nivel mundial representando con 1.8% de este subproducto [43, 44].

Por otro lado, otra industria importante de crecimiento se encuentra la de panificación. Uno de los residuos generados se encuentra el agua residual el cual es generado principalmente a través del proceso de elaboración de productos de panificación, de las operaciones de limpieza del equipo y del lavado del suelo. Este tipo de agua también tiene una alta carga orgánica por contener harina, azúcar, grasa, aceite y levadura y que estos son ingredientes principales para la elaboración de los productos de panificación [43].

Otro sustrato por mencionar en esta investigación están los lodos de depuradora como subproducto generado del tratamiento del agua residual. Existen varios tipos para el tratamiento de estos lodos como el compostaje, la pirolisis, la incineración, sin embargo, aún sigue siendo poco eficiente. Estos lodos arrojados al ambiente sin un tratamiento completo generan una contaminación grave por la composición de metales pesados, por contener algunos patógenos y algunos contaminantes tóxicos [44].

Es por ello que se busca el aprovechamiento de estos residuos a través de las co-digestiones para la obtención de hidrógeno como recurso energético por medio de la fermentación oscura, por lo cual también se reduce la carga orgánica de estos residuos generados en los diferentes procesos. Llevar a cabo una co-digestión presenta muchos **beneficios** debido a que se **mejora el equilibrio de nutrientes**, aumento de la tasa de digestión, aumento de la carga de materia orgánica biodegradable, disminución de la acumulación de amoníaco, así como **la mejora del rendimiento del biogás por el balance de carbono, nitrógeno y nutrientes presentes** [45, 46]. Para ello a continuación se presentan algunas co-digestiones de los sustratos utilizados en esta investigación para la producción de hidrógeno.

1.2.2 Co-digestiones utilizadas en la FO

Se han encontrado varias co-digestiones con suero de queso. En el caso de Gómez-Romero *et al.* [55] trabajaron la **co-digestión de suero de queso crudo con residuos de vegetales y frutas** utilizando cinco relaciones de C/N (41, 47, 48, 49 y 50) bajo las condiciones de operación con un pH de 5.5 y a una temperatura de 37 °C. Obtuvieron una alta tasa de producción de hidrógeno de 10.68 mM H₂ L⁻¹ h⁻¹ y un rendimiento de 449.84 mL H₂ g⁻¹ de DQO en la relación C/N 21. Lo que reafirma en la literatura el operar bajo estas condiciones para la obtención de altas tasas de producción y rendimiento de hidrógeno. Como especies productoras con mayor predominio encontraron *Bifidobacterium* en un 85.4 %, *Klebsiella* (9.1 %), *Lactobacillus* (0.97 %), *Citrobacter* (0.21 %), *Enterobacter* (0.27 %) y *Clostridium* (0.18 %) [55]. Rodrigues Ramos L y Luiz Silva E. [51] trabajaron la **co-digestión de suero de queso con vinaza** en reactores anaerobios de lecho fluidizado (AFBR) a una temperatura de 55 °C (termófilo). Lovato G. *et al.* [52] trabajaron la **co-digestión de suero de queso con glicerina** en un reactor de biopelícula discontinua de secuenciación anaerobia (AnSBBR) con las relaciones 100:0; 75:25; 50:50; 25:75; 0:100 (volumen – volumen) en base seca de DQO y una carga orgánica de 10.1 a 23.9 kg DQO m⁻³ d⁻¹, obteniendo una productividad de H₂ de 129.0 mol H₂ m⁻³ d⁻¹ y con un rendimiento de 5.4 mol H₂ kg DQO⁻¹ con

una completa inhibición de la metanogénesis y donde la glicerina demostró actuar como amortiguador. Presentando microorganismos dominantes a los géneros *Ethanoligenens* y *Megasphaera*.

Por otro lado, con respecto a los lodos de depuradoras se ha encontrado lo siguiente: Yang *et al.* [53], llevaron a cabo la **co-digestión de lodos de depuración con residuos de césped** en el que presentaron una alta acumulación de AGV's en relaciones de 10:80 y por ello optaron por la relación 3:7 obteniendo un rendimiento de H₂ de 45.6 mL g⁻¹ SV⁻¹_{removidos} y una remoción de SV del 13.7 %. Tena M. *et al.* [54] investigaron la influencia de tres tipos de inóculos (inóculo acidogénico, lodo y lodo térmico, relación 50:50) en los Ensayos de Potencial Bioquímico de Hidrógeno a través de la **co-digestión de lodo residuales activados con vinazas**. Presentando un máximo rendimiento de H₂ utilizando lodo como inóculo (177 mL H₂ g⁻¹ SV⁻¹_{removidos}), siendo este un 21 y 36 % más alto que el inóculo acidogénico y el de lodo térmico, siendo más beneficioso para los ensayos lo que también se observó en los aumentos de los porcentajes de Eubacteria: Archea (59.2:40.8 a 92.0:9.0), también acompañados de la producción de AGV's como acético, butírico y propiónico. Kamyab S. *et al.* [55] estudiaron la optimización de cuatro parámetros (pH (6, 7 y 8), temperatura (25, 35 y 45 °C), tiempo de fermentación (12, 24 y 36 h) y concentración de sustrato (g L⁻¹ de hexosa 4, 6.5 y 9)) utilizando **lodo activado de una PTAR y desecho de jarabe de dátil (hexosa)** a través de un diseño factorial 2^k. Obtuvieron una producción máxima de H₂ de 2.30 mol H₂/mol hexosa con el modelo teórico a un pH de 6.2422, temperatura de 27.0909 °C, concentración de azúcar de 4 g L⁻¹ a 36 h de tiempo de fermentación. Li Z. *et al.* [56] trabajaron la **co-digestión de residuos de alimentos y lodo de agua residual** obteniendo un aumento del contenido de H₂ en un 62.4 %, un 29.89 % más que la digestión de los residuos de alimentos. Con un pH entre 6.12 - 6.51, también observaron una disminución del nitrógeno amoniacal total en un 18.67 % con relación de C/N de 15.01-23 obteniendo como H₂ máximo de 62.39 mL g⁻¹ SV⁻¹. Con respecto a la pirosecuenciación se incluyen los miembros del género *Veillonella* y *Clostridium*, de órdenes Bacteroidales y Lactobaciliares.

Escasa literatura se ha encontrado trabajar con agua residual de industria de panificación como sustrato ya sea como una mono-digestión o co-digestión. Nasr, M. *et al.* [57] trabajaron **con agua residual del almidón** con la fermentación secuencial fotooscura con reactores anaerobios con deflectores (ABR) obteniendo una tasa máxima de producción de H₂ (R_m) de 24 mL-H₂ h⁻¹ en el reactor que contenía bacterias de cultivo mixto que fueron inmovilizadas en

nanopartículas de maghemita. Vendruscolo F. [58] en su análisis de literatura con respecto a utilizar almidón como sustrato, encontró que Yokoi *et al.* produjeron hidrógeno en un cultivo continuo mixto por lotes con **almidón como sustrato** incluyendo *Clostridium butyricum* y *Enterobacter aerogenes* teniendo un rendimiento de 2 mol H₂ mol⁻¹ glucosa. Por otro lado, Masset *et al.* utilizaron **glucosa y almidón como sustratos**, *C. butyricum* CWBI1009 para la producción de H₂. La glucosa presentó un rendimiento máximo de 1.7 moles H₂ mol⁻¹ glucosa obtenidos a un pH de 5.2, mientras que al utilizar almidón se obtuvo un rendimiento máximo de 2.0 moles H₂ moles⁻¹ glucosa y una tasa de producción máxima de 15 mol H₂ mol⁻¹ glucosa h⁻¹. En esta literatura también menciona que Akutsu *et al.* produjeron H₂ a partir de almidón como sustrato en un reactor UASB evaluando los efectos del TRH, pH y la concentración del sustrato, obteniendo un rendimiento máximo de H₂ de 2.8 moles H₂ moles⁻¹ glucosa con 20 g L⁻¹ de almidón.

1.2.3 Análisis crítico de la literatura

Se han utilizado diversos sustratos, últimamente como co-digestiones para aumentar la producción de hidrógeno, así como estabilidad amortiguadora, enriquecimiento de nutrientes, balance de carbono y nitrógeno, entre otros. A partir del análisis de la literatura consultada sobre el método de producción biológica por medio de la fermentación oscura, se pueden deducir los siguientes aspectos:

La co-digestión suero de queso crudo con residuos de vegetales y frutas bajo condiciones de operación de pH 5.5 y 37 °C de temperatura con la relación C/N 21, la mayor tasa de producción de hidrógeno fue de 10.68 mM H₂ L⁻¹h⁻¹ y un rendimiento de 449.84 mL H₂ g⁻¹ de DQO con la presencia de *Bifidobacterium* con mayor presencia [Gómez Romero], que en base a la literatura la relación C/N ideal se encuentra entre el rango de 20 - 40. Llevadas a cabo las co-digestiones de vinaza con suero queso en un reactor del tipo AFBR presentando una mayor producción de hidrógeno con la más baja cantidad de sustrato (2 g de DQO L⁻¹ de suero de queso). En otro reactor del tipo AnSBBR se llevó a cabo la co-digestión de suero de queso con glicerina obteniendo una mayor productividad de H₂ de 129.0 mol H₂m⁻³ d⁻¹ y con un rendimiento de 5.4 molH₂ kgDQO⁻¹ al trabajar con la relación de 75:25 (suero de queso y glicerina).

Por otro lado, otro de los sustratos en la mira se encuentran los lodos por generarse en grandes cantidades y la forma en que se disponen no son amigables al ambiente, estos son ricos en materia orgánica, pero presentan desventajas como baja cantidad de carbohidratos por lo

que han sido utilizados en las co-digestiones. Entre ellas se encuentra la co-digestión de lodo de depuración con residuos de césped llevado a cabo en un sistema tipo lote con una optimización para 10 g/L del sustrato teniendo un rendimiento de H₂ de 45.6 mL g⁻¹ SV⁻¹_{removidos}. En la evaluación de varios tipos de lodos para inóculo con la co-digestión de lodo residual activado con vinaza se presentó un máximo rendimiento de H₂ utilizando lodo como inóculo (177 mL H₂ g⁻¹ SV⁻¹_{removidos}), siendo este un 21 y 36 % más alto que el inóculo acidogénico y el de lodo térmico. Por otro lado, obtuvieron una producción máxima de H₂ de 2.30 mol H₂ mol⁻¹ hexosa con el modelo teórico a un pH de 6.2422, temperatura de 27.0909 °C, concentración de azúcar de 4 g L⁻¹ a 36 h de tiempo de fermentación con la co-digestión de lodo activado de una PTAR con desecho de jarabe de dátil (hexosa). Otros sustratos utilizados se encuentran el agua residual de almidón siendo evaluada en un reactor del tipo ABR con FO presentando coeficientes de correlación aceptables (R² > 0.987) con el MGM, con una tasa máxima de producción de H₂ (R_m) de 24 mL-H₂ h⁻¹. Otros autores trabajaron con almidón inoculando con *Clostridium butyricum* y *Enterobacter aerogenes* teniendo un rendimiento de 2 mol H₂ mol⁻¹ glucosa. Otros investigadores trabajaron con harina de trigo hidrolizado con glucosamilasa presentando concentraciones de 10.69 a 35.14 g L⁻¹ de glucosa, el rendimiento máximo de hidrógeno se presentó en 1.9 mol H₂ mol⁻¹ glucosa con una concentración de glucosa de 10.69 g L⁻¹.

Las co-digestiones antes mencionadas brindan un panorama general acerca de parámetros, tipos de reactores, así como el pretratamiento del inóculo. Han sido mencionadas co-digestiones con lodos, sin embargo, lodo con suero de queso, así como la co-digestión de agua residual de industria de panificación con suero de queso no ha sido encontrado en las investigaciones. Por lo tanto, se requiere profundizar en la investigación acerca de las co-digestiones por un lado utilizando agua residual de industria de panificación como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno suero de queso y lodo primario de una PTAR con lodo granular como inóculo. Evaluando parámetros como ambas co-digestiones (agua residual de panificación con suero de queso y agua residual de panificación con lodo primario), así como las relaciones C/N (20, 30 y 40), evaluando las tasas de productividad de H₂ con el modelo de Gompertz modificado. La operación continua para la producción de hidrógeno es también otro punto importante, en este estudio se enfocó en llevar a cabo las co-digestiones en un RAHFA con la finalidad de revisar la distribución del inóculo en el interior del reactor, por lo que esta modalidad no ha sido presentada dentro de la literatura analizada. También es importante destacar que dentro de la literatura analizada no se ha mostrado la evaluación de los parámetros de desempeño del

método analítico para los gases como lo es el hidrógeno y para los AGV's llevados a cabo por cromatografía de gases. Por otro lado, calcular la incertidumbre no ha sido mencionada y es también otro punto importante ya que brinda las diversas magnitudes de entrada hacia el resultado obtenido de la concentración de hidrógeno (%).

1.3 Aportación científica

Optimizar la producción de hidrógeno a través de un reactor de manto de lodos anaerobio de flujo ascendente en el proceso de fermentación oscura.

1.4 Hipótesis

Los parámetros analíticos optimizan la producción de hidrógeno en un reactor de manto de lodo anaerobio de flujo ascendente en el proceso de fermentación oscura.

1.5 Objetivo general

Evaluar los parámetros analíticos para optimizar la producción de hidrógeno a través de un reactor de manto de lodos anaerobio de flujo ascendente.

1.6 Objetivos específicos

1. Realizar muestreo y caracterización fisicoquímica de sustratos ricos en carbohidratos de alta biodegradabilidad empleando métodos espectrofotométricos y gravimétricos.
2. Identificar las variables con efecto significativo en el proceso de fermentación oscura que favorezcan el crecimiento microbiano y mayor rendimiento de hidrógeno.
3. Evaluar los parámetros de desempeño del método analítico para la cuantificación de los gases permanentes y los AGV's por Cromatografía de Gases empleando detector de Conductividad Térmica y detector de Ionización a la Flama, respectivamente.
4. Evaluar la eficiencia de la producción de hidrógeno en microrreactores y reactores.
5. Determinar las constantes cinéticas de producción de hidrógeno a partir del modelo Gompertz modificado (MGM).

6. Implementar las variables analíticas que favorecen la presencia de familias y géneros microbianos productores de hidrógeno en un reactor de flujo ascendente.
7. Evaluar la tasa de producción máxima de hidrógeno con base en los parámetros de operación del reactor.
8. Evaluar la incertidumbre en las etapas de medición de hidrógeno obtenido en la fermentación oscura del reactor.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Marco teórico

2.1.1 Contexto energético y las energías renovables en México

La energía es el motor y la necesidad básica que impulsa el desarrollo económico del mundo por generar factores esenciales para actividades productivas que mejoran el estilo de vida. Jugando un papel muy importante para el desarrollo económico y para la seguridad de cualquier nación. La energía puede ser recuperada en forma de calor, como combustible o electricidad a través de diferentes tecnologías.

Como se ha mencionado previamente, la generación de energía se ha obtenido principalmente por combustibles fósiles [59]. El consumo de energía ha aumentado un 43.4 % en las últimas dos décadas [60]. Esta demanda ha generado cambios en los costos del petróleo crudo aumentando de \$50.84 por barril en 2017 a \$61.20 por barril en 2020. Así mismo la demanda mundial de energía seguirá acrecentándose hasta 30 TW para el año 2050.

A pesar que los combustibles fósiles contribuyen el 86.4 % para las necesidades energéticas mundiales, estos son la causa principal de contaminación ambiental, del calentamiento global y su irrestricto uso puede acabar con las reservas en un futuro próximo [60].

De manera obligada se da la necesidad de la búsqueda de otros combustibles renovables, ecológicos y sostenibles. Se ha observado que el uso de la energía renovable ha crecido un 17% a nivel mundial, siendo preferidas por su naturaleza regenerativa y que son económicas en comparación de los combustibles fósiles [60], por otra parte se deben tener presentes las desventajas tecnológicas como el almacenamiento de energía o la captación eficiente de energía solar. Estas tecnologías se presentan como alternativas para satisfacer la demanda mundial de energía, pero se debe continuar estudiando los diferentes parámetros para presentarla como la solución de la actual crisis energética.

Con las modificaciones estructurales al sector energético mexicano que incorporan el uso de fuentes de energías económicas se podrían hacer accesibles los costos domésticos de la electricidad, y por ende promover la producción nacional [61]. Aunque aún se tiende a enfatizar hacia fuentes de energía convencional como el gas natural, existen esfuerzos gubernamentales para promover la producción de energías limpias entre ellas las renovables para la producción de energía eléctrica. México presenta una gran cantidad de recursos en el ámbito de las fuentes de energía renovable como las solares, eólicas, biomasa, hidroeléctricas y geotérmicas [59, 61].

En los recientes años, en México se han desarrollado varios proyectos de energía renovable [61]. Pérez-Denicia *et al.*, [62] mencionan que se han generado 62 GWh año⁻¹ a partir de tecnología solar fotovoltaica, donde 13 de los 62 GWh año⁻¹ fueron generados por dos plantas de la CFE y los restantes 49 GWh año⁻¹ fueron producidos por seis proyectos privados. Por otra parte, la generación a través de energía eólica se calcula en 19,805 GWh año⁻¹, donde la tecnología de energía eólica terrestre genera 7675 GWh año⁻¹, distribuidos en 220 GWh año⁻¹ de la CFE y 7455 GWh año⁻¹ de 27 a través de productores privados [61].

Los esfuerzos para hacer de México una entidad respetuosa con la energía renovable sigue siendo un asunto complicado. El país está trabajando en una combinación ambiciosa de leyes con la finalidad de alejar a la nación de los combustibles fósiles. La adopción de energías renovables también depende de los valores sociales de los consumidores que pudieran estar dispuestos a la adopción de una nueva innovación energética. El financiamiento de proyectos también es otro tema por hablar, pero ha ido madurando y creciendo en los recientes años [61]. Actualmente se necesita que la investigación y la inversión trabajen a la par, en la cual la investigación permitirá estudiar aspectos sobre comunidades bacterianas, tipos de sustratos, configuraciones de reactores, optimización por medio de diseños de experimentos.

2.1.2 El hidrógeno como recurso energético

El constante cambio de estilo de vida demanda más consumo de energía, pero bajo un esquema de respeto al medio ambiente y los combustibles fósiles no proporcionarán a futuro ésta demanda. El desarrollo de los biocombustibles como fuente renovable se presenta como alternativa para resolver este problema. De manera que el hidrógeno se perfila como combustible limpio y energéticamente competente [60].

El hidrógeno (H₂) es el elemento más ligero de la tabla periódica, un gas que no se encuentra libremente disponible en el ambiente, altamente combustible, con un valor de rendimiento energético aproximadamente de 120,000 KJ.kg⁻¹, siendo tres veces más alto que la gasolina (47.4 KJ.kg⁻¹) y cuatro veces más alto que el biodiesel (37.0 KJ.kg⁻¹), generando agua como subproducto de la combustión [60, 63]. En la **Tabla 1** se resumen las propiedades de diferentes combustibles incluyendo el hidrógeno [10].

Tabla 1. Tabla comparativa de las propiedades fisicoquímicas de los combustibles con mayor potencial energético [10].

Características	Hidrógeno	Gasolina	Metano	Butanol	Etanol	Metanol
Fórmula	H ₂	H, C ₄ -C ₁₂	CH ₄	C ₄ H ₉ OH	CH ₃ CH ₂ OH	CH ₃ OH
Peso molecular (kg kmol ⁻¹)	2.02	100-105	16.04	74.12	46.07	32.04
Punto de ebullición (°C)	-253	32-210	-162	118	78	65
Temperatura de auto-ignición	585	280	540	343	365	435
Densidad energética (MJ kg ⁻¹)	120-142	44.5	50-55.5	33.1	26.9	19.6
Relación aire/combustible	34.3	14.6	17.19	11.2	9.0	6.5
Número de octanaje del motor	-	81-89	120	78	102	104
Viscosidad a 25 C (mPa s)	0.009	0.6	0.011	2.573	1.074	0.544
Valor de calentamiento superior (kJ g ⁻¹)	141.9	47.5	55.5	37.3	29.7	20
Punto de inflamación (°C)	< -253	-43	-188	28.9	13	11

El hidrógeno ha ejercido un papel muy importante en distintos sectores industriales como materia prima, un ejemplo de ello es en la industria química para la fabricación de varios compuestos, entre ellos la producción de amoníaco [47, 64]. También el hidrógeno es utilizado para la hidratación de aceites para la elaboración de combustibles, para la hidratación de alimentos y para la producción de fertilizantes, siendo este uno de los mayores usuarios [65]. Es importante tener en cuenta que la demanda del hidrógeno por las aplicaciones industriales ha estado creciendo durante varias décadas. Según AIE (Agencia de Energía Internacional) la demanda ha aumentado de 30 Mt de hidrógeno en 1975 a 115 Mt en 2018, ya sea en forma pura o como mezcla con otros gases. Se contempla que para 2040 se tenga una demanda de 45 Mt con 40% de hidrógeno verde y para 2050 de 60 Mt con 75% de hidrógeno verde, basado en bioenergía ya sea a través de biogás, biomasa o electrólisis [66].

2.1.3 Producción de hidrógeno a partir de procesos biológicos

Con respecto a los métodos de producción de hidrógeno, destacan los que se generan de manera biológica operando a temperatura ambiente y a presiones atmosféricas, es por ello que consumen menos energía siendo respetuosos con el medio ambiente, además de la fácil adquisición de materias primas por ser materiales de desecho orgánico generadas a partir de la actividad antropogénica [47, 64, 67, 68]. Véase **Figura 1**.



Figura 1. Producción biológica de hidrógeno como fuente renovable de energía [64, 69].

La producción biológica por bacterias fermentativas es más viable que en comparación con bacterias fotosintéticas. Otro de los puntos interesantes es que en este proceso se utilizan residuos orgánicos incluyendo sólidos y agua residual los cuales contienen diferentes materiales orgánicos e inorgánicos, con un alto contenido de carbohidratos y nutrientes como nitrógeno, fósforo y minerales. Es por ello que la tendencia de la investigación se enfoca al estudio de la fase de la digestión anaerobia fermentativa por la producción de hidrógeno a partir de los residuos orgánicos, por medio de la llamada FO que representa en las primeras etapas de la degradación de la materia orgánica. Convirtiéndola en una amplia área de investigación por la valoración y explotación de estos residuos orgánicos y al mismo tiempo abordando las preocupaciones ambientales [47, 64, 70, 71].

El hidrógeno es el producto del metabolismo de una amplia diversidad de microorganismos del dominio Archea (procariotas), Bacteria (aérobicas, anaerobias y facultativas), Cianobacterias y Eucariotas (algas verdes) dando lugar a diferentes ciclos bioquímicos [48, 72].

2.1.4 Fermentación oscura

La digestión anaerobia se lleva a cabo en cuatro etapas para la degradación de la materia orgánica: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y la metanogénesis, **en la cual la fermentación oscura sigue este mismo proceso sin llegar hasta la metanogénesis** (por medio del pretratamiento térmico)[73]. Las bacterias fermentativas son los principales responsables de llevar a cabo la hidrólisis, la acidogénesis y la acetogénesis que es el interés de este trabajo, por otro lado, los metanógenos participan en la última etapa (metanogénesis) transformando los productos intermedios a CH₄ y CO₂ como productos finales [48]. La fermentación oscura (FO) es un proceso desarrollado bajo condiciones anaeróbicas o anóxicas a partir de sustratos con un alto contenido de carbohidratos como fuente de carbono descomponiéndolos para la formación de hidrógeno y otros intermediarios como {AGV's}, en ausencia de luz y en presencia de un consorcio de **bacterias anaerobias facultativas** predominantemente *Enterobacter sp.* o **anaerobias obligadas** como *Clostridium sp.* formadoras de esporas como la más ampliamente reportada [47, 49, 63, 67, 74, 75].

Los microorganismos tienen un variado mecanismo metabólico para la transformación de diferentes sustratos hacia distintas formas de energía, permitiendo una libre asociación entre otros microorganismos receptores de electrones [10, 76]. Las rutas de producción de hidrógeno se dividen en dos tipos dependiendo de las enzimas que metabolizan el piruvato; por la **vía (A)**

Piruvato-Formiato-Liasa (PFL) representando la **fermentación anaeróbica facultativa** y por la **vía (B) Piruvato-Ferredoxina-Oxirreductasa (PFOR)** para la **fermentación anaerobia estricta**, en ambas vías la glucosa se convierte en piruvato por medio de la glicólisis, y el NAD^+ producido se reduce a NADH generando ATP, el NADH producido se oxida otra vez a NAD^+ para que esté disponible nuevamente la ronda de glicólisis, esto es cuando el piruvato se reduce por el NADH formando productos finales. Por otro lado, los productos reductores finales por la vía PFOR se encuentran el etanol, el propionato, el butirato y el butanol y para la vía PFL predominan el lactato, el acetato o el etanol. Los anaerobios facultativos transforman el piruvato en formiato y acetil-CoA y los anaerobios estrictos metabolizan el piruvato a acetil-CoA, CO_2 y la ferredoxina es reducida, en ambas vías metabólicas parte del acetil-CoA se debe transformar en un producto reducido y el resto es utilizado para la síntesis de ATP. Las vías metabólicas llevan a la generación de H_2 a partir de los residuos orgánicos como se muestra en la **Figura 2** [77].

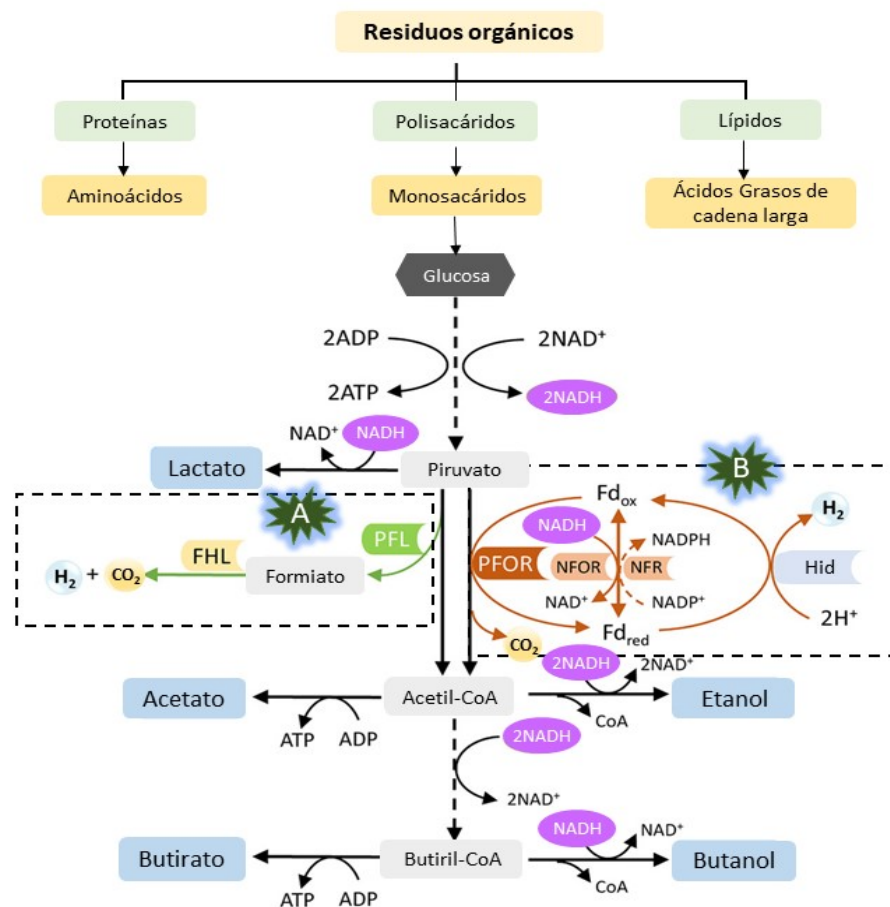


Figura 2. Rutas metabólicas para la producción de H_2 a través de la fermentación oscura. Imagen adaptada [77].

Especies productoras de hidrógeno

Se pensaba que la capacidad para producir hidrógeno en los procesos de fermentación anaerobia se encontraba restringida únicamente a las especies de *Clostridium*. Sin embargo, tras el avance en las técnicas y herramientas de caracterización molecular han permitido evidenciar la diversidad filogenética y metabólica de otras especies productoras de hidrógeno. Encontrándose variedades como (i) bacterias anaerobias obligadas o estrictas formadoras de esporas, (ii) bacterias anaerobias obligadas no formadoras de esporas auxiliares y (iii) anaerobios facultativos [78].

Dentro de los anaerobios estrictos se encuentran las especies *Clostridium* (mono-digestiones, xilosa y glucosa [79]), *Clostridium spp* (mono-digestión, agua residual de la industria cervecera inoculada con lodo desnitrificante), *Clostridium butyricum* (mono-digestión, aislado de desechos de levadura de cerveza), *Clostridium pasteurianum* (mono-digestión, melaza condensada con cultivo mixto), encontrándose que las diferentes especies de *Clostridium* muestran patrones metabólicos diferenciales y la abundancia varía según el tipo de sustrato, condiciones operativas y configuraciones que estén en el proceso [78]. *Etanolígeno* (mono-digestión, lodos anaerobios activados de AR de melaza), *Desulfovibrio* (en glucosa [80]). Otras bacterias fermentadoras también se encuentran los *Ethanoligenens harbinense* y *Acetoanaerobacterium elongatum* (mono-digestión, melaza de agua residual de refinera de azúcar), produciendo además de hidrógeno, etanol y ácido acético, también se han encontrado *Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans* en reactores UASB [78].

Dentro de las bacterias anaerobias obligadas no formadoras de esporas se encuentra *Megasphaera*. *Megasphaera esdenii* se encontró como la dominante en el proceso de fermentación siendo inoculada con desperdicios bovinos y alimentado con purines. *Acidaminococcus sp.* fue encontrada en la fermentación de melaza. Otro tipo de anaerobio es la *Prevotella sp.*, que puede tener una contribución positiva por descomponer sustratos complejos o como contribución negativa al competir por los sustratos (co-digestión, glucosa y glicerol) [78]. Sin embargo, estas bacterias no forman esporas y su contribución a la producción de hidrógeno no es clara [Cabrol 2017].

Por otro lado, se encuentran los anaerobios facultativos y su presencia suele estar limitada por los drásticos pretratamientos que se les hacen a los sustratos o al inóculo. Estos anaerobios presentan bajos rendimientos teóricos ($< 4 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ de glucosa), sin embargo, siguen siendo atractivos por su baja sensibilidad hacia el oxígeno, agotando rápidamente el oxígeno presente

en el cultivo ya sea en el inicio o después de un daño accidental por oxígeno, encontrándose las especies de la familia *Enterobacteriaceae* [78], (mono-digestiones, en glucosa, sucrosa [79], *Enterobacter aerogenes* por fermentación de glicerol [81]), mono-digestión, melaza de remolacha azucarera inoculado con lodo no tratado [78]), *Citrobacter* (mono-digestión, aislado del lodo de agua residual [79]), *Citrobacter* spp. (mono-digestión, agua residual de melaza [78]), *Klebsiella* (mono-digestión, aislado de un lodo de depuradora), *Escherichia coli* (mono-digestión, aislado de lodo de una depuradora municipal) [82] y otros anaerobios facultativos formadores de esporas se encuentran los *Bacillus*, cuya ventaja también es la baja sensibilidad al oxígeno y son resistentes al pretratamiento de choque térmico, su versatilidad metabólica también les ayuda a utilizar diferentes sustratos así como la biomasa lignocelulósica, su amplia capacidad de resistir a diferentes concentraciones de sal y variaciones de pH (mono-digestiones, lodo de agua residual anaeróbico, estiércol de ganado [78, 79]).

Las reacciones que se llevan a cabo en las especies productoras de hidrógeno liberan energía en las rutas metabólicas para la formación de ATP por lo general son reacciones del tipo óxido-reducción, donde en la oxidación se pierde uno o más electrones y en la reducción se gana uno o más electrones. Estas reacciones redox (óxido-reducción) se dan en pareja, entre ellos difieren en su tendencia inherente de donar o aceptar electrones expresándose como potencial de reducción (E_o' en condiciones estándar) midiéndose en voltios (V) [83].

La **FO** cataboliza de manera anaerobia a la materia orgánica se **presentan reacciones redox** en ausencia de aceptores de electrones como el oxígeno, el sulfato, entre otros [71]. Para observar de manera representativa las transferencias de electrones en sistemas biológicos es visualizar una torre con escala redox disponiendo los donadores (sustancia reducida) en la parte superior y los aceptores (sustancia oxidada) en la parte inferior, que se puede apreciar en la **Figura 3** [82, 83].

Los electrones serán captados por los aceptores en cualquier nivel intermedio siempre y cuando el par donador sea más negativo que el aceptor. Entre más grande sea la diferencia de potencial de la energía de reducción entre el donador y el aceptor más energía se libera en la reacción neta, siendo esta energía $\Delta E_o'$ proporcional a $\Delta G^{o'}$ (energía libre de Gibbs) que en otras palabras la diferencia de potencial entre las especies que intervienen durante las reacciones es proporcional a la espontaneidad (energía libre de Gibbs) de un electrón transferirse de un

compuesto a otro, de manera que las células transforman esta espontaneidad de la reacción en energía química útil para los procesos metabólicos [83].

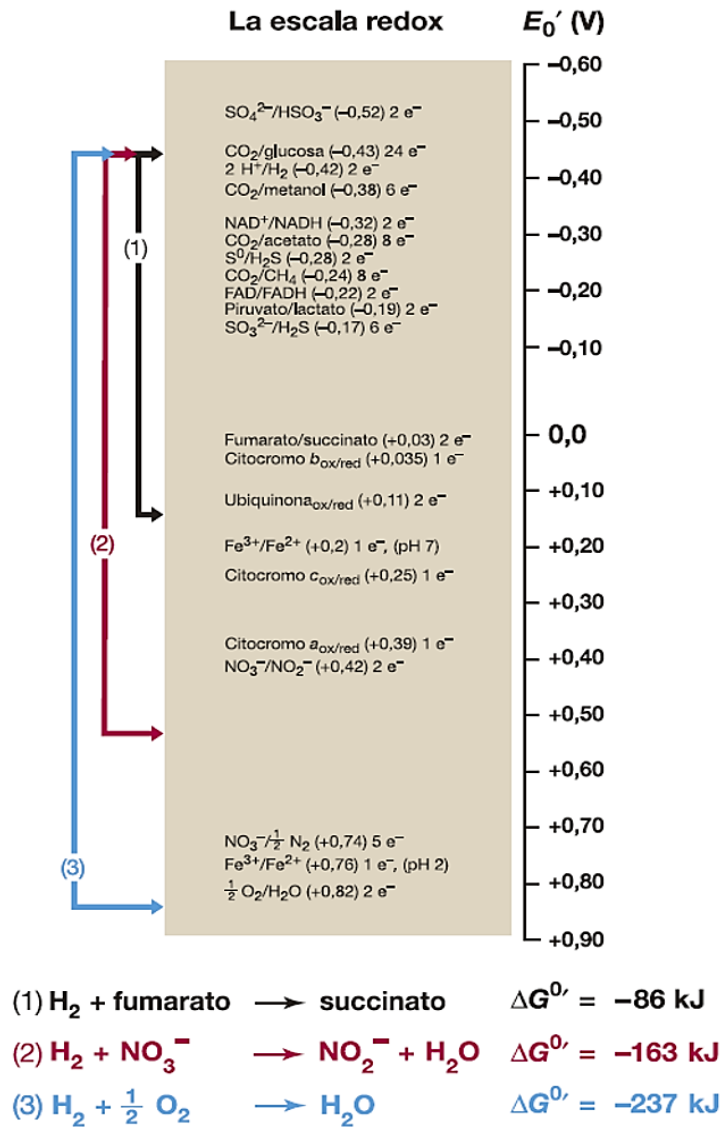
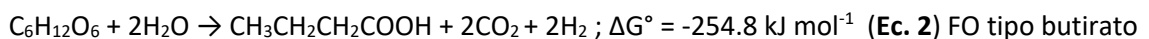
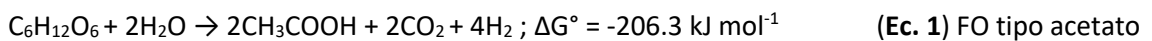


Figura 3. Torre redox. Imagen tomada del libro Brock [83].

Mediante las siguientes reacciones se puede observar en la perspectiva termodinámica el metabolismo de la glucosa que produce 2 moles de acetato y 4 moles de H_2 en la fermentación oscura del tipo acetato, sin embargo, al observar la energía libre de Gibbs la FO del tipo butirato es la que predomina sobre la del tipo acetato [79].



En los últimos años la ingeniería metabólica está teniendo peso por el potencial que tiene de mejorar el rendimiento del H₂, teniendo como principales obstáculos en la fermentación algunas restricciones de vías metabólicas involucradas. Por lo que recientes investigaciones indican la modificación de las vías existentes o la introducción de enzimas para superar las barreras metabólicas o termodinámicas, como es el caso de inactivar reacciones competitivas entre sí por el mismo sustrato o la eliminación de ciertas hidrogenasas. Con respecto a las bacterias como *Clostridium* se puede inhabilitar la captación de hidrogenasas o inhabilitando el sistema de oxígeno dando una producción de hidrógeno más robusta. Por lo que se requiere de una mayor investigación en estos puntos para la finalidad de tener un mayor rendimiento del H₂ [50].

2.1.5 Rendimiento y tasa de producción de hidrógeno

La obtención de hidrógeno en los procesos fermentativos se puede cuantificar en los términos de rendimiento y tasa de producción. Donde **el rendimiento de producción** es definido como la cantidad de H₂ producido por la cantidad de sustrato que fue consumido expresándose en unidades de mol H₂/mol de glucosa, mientras que **la tasa de producción** es definida como la cantidad de H₂ en mL producidos por unidad de tiempo y por unidad de volumen del reactor siendo este la tasa volumétrica o por unidad de biomasa siendo este la tasa específica [84].

2.1.6 Factores que establecen la producción de hidrógeno

Existen varios factores que afectan el rendimiento del sistema de producción de hidrógeno en la fermentación oscura [85]. Entre los factores que destacan se encuentra el pH, la temperatura, el Tiempo de Retención Hidráulico (TRH), la tasa de carga orgánica (OLR), la presión parcial, el tipo de sustrato (azúcar simple o carbohidrato complejo), la concentración del sustrato, el perfil y la concentración de metabolitos producidos, el tipo de sustrato, el tipo de inóculo (cepa de microorganismos mezclados o puros), la composición de los nutrientes, presencia de compuestos inhibidores del proceso, la relación C/N, la condición ambiental y el eficiente contacto que se establece entre la biomasa y el agua residual, la operación, diseño y configuración de los reactores que son llevados en la fermentación oscura [49, 60, 67, 86].

Un parámetro crucial de gran importancia que se debe controlar en el proceso de digestión anaerobia es **el pH** [85], debido a que interfiere en las actividades enzimáticas, en el transporte de metabolitos y sobre todo a las actividades vitales de las comunidades microbianas [67, 86, 87]. Los cambios de pH también propician cambios metabólicos, lo que significa que los

microorganismos pueden cambiar de una vía metabólica a otra [87]. La disminución de pH afecta el crecimiento y la producción metabólica de las bacterias y a su vez refleja la concentración total del disolvente, se menciona que en el rango de pH de 4.5 a 9 es considerado eficaz para la producción de H₂, ya que la tasa de producción acumulada de hidrógeno (VHPR) y el rendimiento (HY) tienen influencia con los cambios de pH donde la acumulación de hidrógeno es dependiente del pH y este varía inversamente con el rendimiento [49]. Así también valores altos de pH pueden disminuir la capacidad de producción de las bacterias [85].

La temperatura también es otro factor de suma importancia debido a que la degradación del sustrato, el crecimiento y el metabolismo microbiano, producción de hidrógeno y subproductos son dependientes. Cada microorganismo tiene un rango óptimo de temperatura para su replicación, por lo que un cambio de temperatura alteraría la estructura microbiana que esté presente en la fermentación. Entre los rangos de temperatura efectivas para la producción de H₂ se encuentran entre 25 – 60 °C, presentando más eficiencia entre 30 – 49 °C (temperatura para los mesófilos) además de ser beneficioso en términos de costos, recuperación de energía y un aumento el rendimiento de la producción acumulada de hidrógeno (CHP). Un aumento de temperatura dirige a la degradación de las enzimas involucradas en la producción de H₂ [49, 50].

El TRH definido como la duración promedio del tiempo en que la materia (sustratos y biomasa) permanece en el reactor, en el escalado es importante por establecer la tasa de flujo. Este debe permitir la solubilización de la compleja materia orgánica la cual permitirá llevar a cabo la fermentación acidógena, sin embargo, tiempos largos minimizan la cantidad de sustrato por día y con ello beneficia a los metanógenos. Dependerá del tipo de sustrato para que el TRH reprima el proceso de metanogénesis durante la fermentación [49, 50].

La Tasa de Carga Orgánica que indica la cantidad de sustrato para la alimentación del reactor por día por unidad de volumen de trabajo, también influye en la producción de hidrógeno [50]. Esto también depende de la configuración del reactor, el pH, temperatura y tipo de sustrato, sin embargo se ha encontrado que una alta carga orgánica podría inhibir la producción de hidrógeno debido al aumento de los AGV's [76].

El tipo de sustrato tiene gran predominio en la eficiencia de la producción de hidrógeno. Han sido utilizados azúcares simples como la glucosa, la maltosa y la xilosa fácilmente biodegradables. Como carbohidrato complejo se encuentra el almidón, el cual por hidrólisis ácida o enzimática, se convierte en glucosa y maltosa. La celulosa también ha sido investigada, sin embargo se presentan bajos rendimientos de hidrógeno debido a que la mayoría de los

microorganismos no pueden consumir directamente la celulosa [77]. Utilizar un sustrato puro como la glucosa, la sacarosa o el almidón no es conveniente por su baja disponibilidad y su alto costo, sin embargo, existe una diversidad de materias renovables como desechos orgánicos, efluentes de origen industrial, agrícola, forestal, municipal o doméstico que son ideales por tener un alto contenido de carbohidratos y por presentar rendimientos de hidrógeno mayores o similares a los sustratos puros [50, 77].

Se pueden utilizar dos **tipos de inóculo** para la producción de hidrógeno, ya sea cultivo puro como *Clostridium sp.* o como cultivos mixtos como el lodo anaeróbico, el cual este último es más práctico, más atractivo en el sector industrial y además por tener la capacidad de degradar a una amplia gama de materias primas [88]. Los consorcios también son ventajosos por no requerir de esterilización del medio de cultivo [89]. Sin embargo, en los cultivos mixtos existe la presencia de bacterias metanógenas que son consumidoras de hidrógeno, una forma de inhibición y/o eliminación son pretratados por choque térmico, con ácidos o álcalis, pretratamientos químicos [80].

Los elementos traza como los iones metálicos (Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} y el Fe^{2+}) son cofactores de enzimas esenciales para la síntesis de hidrógeno. El hierro y el níquel son elementos para las hidrogenasas; el magnesio actúa como agente activador de la quinasa y la sintetasa; reductores de aminoácidos como L-cisteína mantienen el potencial óxido-reducción [50].

La configuración del reactor influye en los fenómenos de transferencia de masa líquido-gas generando un cambio en la comunidad microbiana, así como los desplazamientos metabólicos/enzimáticos. Otro aspecto a tomar en cuenta es que deben ser de bajo costo, ejemplo de ellos se encuentran los reactores que se utilizan en el tratamiento de agua residual. Un reactor de uso común es del tanque de agitación continua (CSTR) donde se debe tener una eficiente homogeneización entre la biomasa en suspensión con los sustratos. También se encuentran los reactores de lecho compacto (PBR), reactores de lecho fluidizado anaerobio (AFBR), reactores de manto de lodo anaerobio de flujo ascendente (UASB), entre otros [90].

Todo esto son factores que producen un efecto significativo sobre los rendimientos de la fermentación del hidrógeno a partir de la gran variabilidad de sustratos [91].

También es de suma importancia que antes de emitir un resultado para una investigación se presenta una toma de decisiones para la validez del resultado, generando la necesidad de obtener un resultado fiable. Por lo que los laboratorios realizan las mediciones bajo normativas como la ISO/IEC 17025, cuya norma incluye validaciones, verificaciones o evaluaciones de

parámetros de desempeño de los métodos para la obtención de datos analíticos fiables de alta calidad. Cuyos parámetros del método comprenden a la linealidad, la precisión y la incertidumbre.

2.1.7 Reactores biológicos

La producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura puede llevarse en diferentes tipos de reactores que presentan diferentes configuraciones particulares, entre ellos se encuentran el reactor anaerobio de manto de lodos de flujo ascendente (UASB), reactor de filtro anaerobio (AF) y reactor de lecho fijo (FBR), reactor de tanque agitación continua (CSTR), entre otros [48, 90].

Reactor anaerobio de flujo ascendente

Dentro de la gran diversidad de diseños de reactores para la producción de hidrógeno a través del proceso de fermentación, entre los que destacan se encuentra el reactor anaerobio de manto de lodos de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés) [92]. Estos tipos de reactores han sido construidos en México para el tratamiento de agua residual industrial y doméstica [93]. Presentan mayor relevancia al considerar un proceso de operación continuo lo que le permite trabajar con grandes volúmenes de muestra, trata efluentes líquidos de alta carga orgánica a cortos TRH presentando eficiencias del 90%, entre otros [92, 94].

Este tipo de reactor tiene una estructura longitudinal cilíndrica o rectangular, teniendo en la parte superior un separador de fases gas/líquido/sólido. La alimentación comienza con el inóculo y el sustrato es ingresado de la parte inferior del reactor. Por lo que se formará una cama de lodo denso (granular o flocular) dependiendo de las condiciones de operación, del inóculo y del tipo de sustrato. Los componentes orgánicos solubles son convertidos en biogás por medio de la alimentación del sustrato de manera ascendente. Se presenta un contacto eficiente entre el sustrato y el inóculo al ingresar de manera ascendente por las burbujas de gas generadas que permiten levantar el inóculo. Lo que permite reducir la demanda de energía y costo por no mezclar de manera mecánica [95].

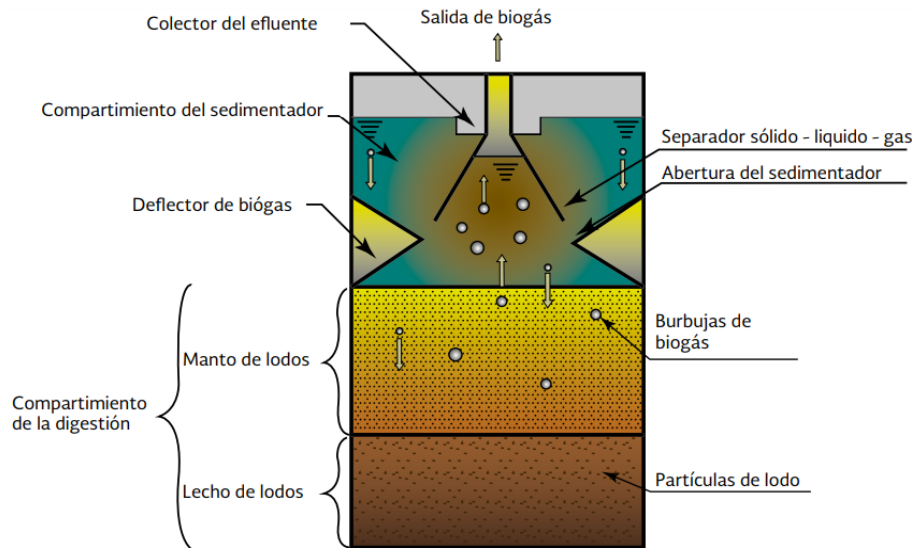


Figura 4. Representación de un reactor anaerobio de manto de lodo de flujo ascendente (UASB). Tomado del manual de agua potable de CONAGUA [93].

Reactor anaerobio híbrido de flujo ascendente

De las ventajas que presentan los reactores UASB, aún siguen presentando limitaciones en la aplicación práctica, como los tiempos iniciales de larga duración, el tipo de inóculo que puede minimizar los arrastres de biomasa, los TRH, entre otros. Los reactores híbridos pueden irse modificando, como en el caso de colocarles estructuras de soporte en suspensión para la aceleración del proceso, llamándoles RAHFA. Este tipo de reactor ha sido operado en el tratamiento de agua residual con compuestos fenólicos, presentando como ventaja un corto TRH por la mayor retención de concentración de biomasa. Este tipo de reactor también presentó otra ventaja, como la mayor área de contacto entre el sustrato y el lodo, además de minimizar la pérdida de dicho lodo y como se ha mencionado la reducción de un TRH siendo una variable operativa de fácil manipulación [96].

Se han operado estos reactores híbridos también para la producción de hidrógeno utilizando glucosa como sustrato, donde se demostró la comparación que en este tipo de reactor con un reactor CSRT a diferentes TRH (12 – 2 h), presentaba mayor estabilidad y mayores volúmenes de producción de hidrógeno ($19.05 \text{ mMol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) [96].

En este proyecto de investigación se busca evaluar para la producción de hidrógeno dos tipos de co-digestión, así como tres TRH (3, 8 y 12 h) con este tipo de reactor RAHFA.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diagrama general de la metodología experimental

En la **Figura 5**, se presenta un esquema general de la metodología experimental desde el muestreo y caracterización de los sustratos que se utilizaron para las co-digestiones anaerobias en la primera etapa siendo este el montaje de reactores en el sistema tipo lote, posteriormente se llevó el escalamiento del reactor anaerobio de flujo ascendente y también para un prototipo de reactor híbrido de flujo ascendente evaluando tres tiempos de retención hidráulica. A partir de los diferentes parámetros analizados en esta investigación se realizó el cálculo del rendimiento y la tasa de producción del hidrógeno.

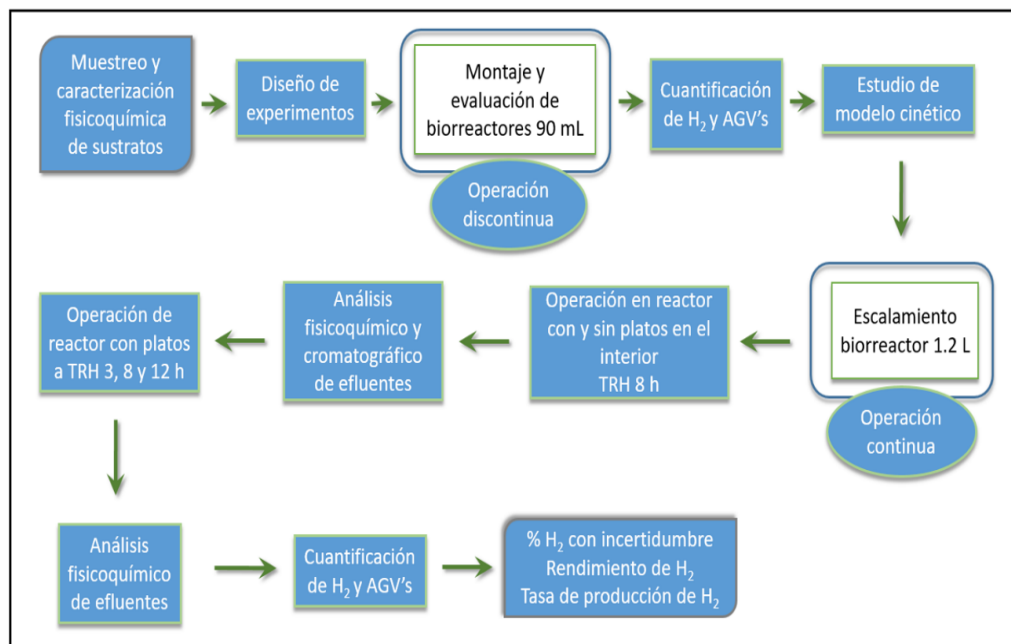


Figura 5. Esquema representativo de las etapas de la metodología experimental desarrollada durante la investigación.

3.2 Sustratos para las co-digestiones e inóculo

Dentro de la primera etapa de la metodología se llevó a cabo el muestreo para los tres sustratos que se emplearon en la parte experimental; i) suero de queso dulce proveniente de la elaboración de queso panela correspondiente al primer lavado de este producto, proporcionado por la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (SS), ii) agua residual de una industria panificadora (HS) y iii) lodo primario de una PTAR (HL), ambas provenientes de la zona metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México. El muestreo para el suero de queso y el AR de panificación se llevaron bajo el PROY-NMX-AA-003/3-SCFI-2008 e ISO 5667-10:1992 [97, 98] y para la muestra de lodo primario se llevó a cabo bajo la norma NOM-004-SEMARNAT-2002 y la EPA 832-B-93-005 [99, 100]. Posterior de la recolección se realizó la caracterización de los sustratos (análisis de pH, CH, NT, DQO, ST, STV, SST) dentro de las primeras 24 horas.

Por otra parte, el inóculo que se utilizó como consorcio microbiano mixto consistió de un lodo granular anaerobio proveniente de un reactor anaerobio de mezcla completa (CSTR industrial) proporcionado por una PTAR de la zona industrial de Monterrey, Nuevo León, México.

Como parte de la caracterización fisicoquímica reportada por Reyna-Gómez *et al.* el inóculo presentó un pH > 7 y una carga orgánica de 66 ± 2.5 g DQO L⁻¹. El inóculo se colocó en un matraz Erlenmeyer y se tapó con un algodón envuelto en gasa para hacerle un pretratamiento térmico a baño María (100 °C por 1 h) [20] seguido de un enfriamiento a temperatura ambiente, con la finalidad de inhibir la actividad microbiana de las bacterias metanogénicas y favorecer aquellas bacterias productoras de hidrógeno, así como la activación de esporas.



Figura 6. Pretratamiento térmico para el inóculo empleado durante las reacciones de fermentación oscura en un reactor en lote o en reactor anaerobio de flujo ascendente.

3.3 Caracterización fisicoquímica de los sustratos

Posteriormente de la recolección se caracterizaron los tres sustratos in situ (suero de queso (SS), agua residual de industria de panificación (HS) y lodo primario (HL)) a través de los siguientes parámetros: pH con el método de la NMX-AA-008-SCFI-2016 y la ISO 10523:2008 [101, 102], (CT) con el método colorimétrico fenol-sulfúrico [103], (DQO) con el método de reflujo cerrado de la NMX-AA-030-SCFI-2001, la ASTM D-1252-83 y del método 5225-C [104, 105, 106], (NT) con el Método 10072, HACH de digestión de persulfato [107], Sólidos Totales (ST), (STV) y (SST) con el método de la NMX-034-SCFI-2015 y el método 2540 del Standard Methods [108, 109, 110].

A continuación, se describen las técnicas utilizadas para la caracterización de dichos sustratos SS, HS y HL con la finalidad de conocer las características de las muestras, así como la concentración de carbohidratos y de nitrógeno para la preparación de las relaciones C/N.

Potencial de Hidrógeno (pH)

Para la medición de pH se utilizó un medidor de pH digital (Thermo Scientific®, modelo Orion, H05399) siendo previamente verificado con disoluciones patrón trazables (disoluciones *buffer* de pH 4, 7 y 10). La medición se hizo de manera directa sumergiendo el electrodo de pH en la muestra homogeneizada tomada en un vaso de precipitado, realizando tres lecturas entre las cuales no presenten una variación mayor de 0.03 unidades de pH entre ellas y posteriormente registrar el promedio para cada muestra.



Figura 7. Prueba de medición de pH para las diferentes muestras de mono-digestión o co-digestión en reactor en lote o en un reactor anaerobio de flujo ascendente.

Carbohidratos Totales (CT)

Para la determinación de carbohidratos totales se realizó con la técnica modificada de fenol-sulfúrico o método DuBois, que consiste en adicionar a un tubo de ensaye con tapa de rosca 1 mL de muestra o agua destilada (blanco), 0.5 mL de fenol al 5% (p/v) y 3.5 mL de H₂SO₄

concentrado (96 - 98%), se homogeneiza en el vórtex y se deja enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se mide la absorbancia de las muestras a 480 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Perkin Elmer®, modelo Lambda 365). La cuantificación de los carbohidratos se calculó a través de la ecuación de la recta obtenida de una curva de calibración previamente preparada en un intervalo de trabajo de 10 a 100 mg L⁻¹.



Figura 8. Prueba de carbohidratos totales para las diferentes muestras de mono-digestión o co-digestión en reactor en lote o en un reactor anaerobio de flujo ascendente.

Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Para la cuantificación de DQO se utilizó el método de reflujo cerrado/método espectrofotométrico comenzando a precalentar el digestor (HACH®, modelo DRB200) a 150 °C. A continuación, en tubos de ensaye con tapa con cubierta interior de TPF se colocaron 1.5 mL de disolución de digestión A, 2.5 mL de la muestra previamente homogeneizada o agua destilada (en el caso de un blanco) y 3.5 mL de la disolución digestora (ácido sulfúrico-sulfato de plata) y se cerraron inmediatamente los tubos para invertirlos varias veces y permitir la mezcla suave del contenido. Todos los tubos son colocados en el digestor a 150 °C durante 2 horas. Posteriormente se enfrían y proceder a medir la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Perkin Elmer®, modelo Lambda 365) previamente calibrado. La cuantificación de la DQO se calculó a través de la ecuación de la recta obtenida de una curva de calibración previamente preparada en un intervalo de trabajo de 200 a 1000 mg L⁻¹.



Figura 9. Prueba de Demanda Química de Oxígeno para las diferentes muestras de mono-digestión o co-digestión en reactor en lote o en un reactor anaerobio de flujo ascendente.

Nitrógeno Total (NT)

Para la cuantificación de NT se utilizó el método de digestión de persulfato HACH 10072 [107] comenzando a precalentar el digestor (HACH®, modelo DRB200) a 105 °C. Se procede a agregar el sobre de persulfato a cada tubo de hidróxido y a continuación se adiciona 0.5 mL de la muestra o agua destilada para el blanco, se llevan los tubos al digestor por 30 minutos. Pasado este tiempo se retiran los tubos para enfriarlos a temperatura ambiente. Se destapan los viales y se coloca el contenido del reactivo A, cerrar e invertir por 15 segundos y dejar reaccionar durante 3 minutos. Por último, agregar el contenido del reactivo B, cerrar e invertir por 15 segundos y dejar reaccionar por 2 minutos. Posteriormente, tomar 2 mL de este tubo y transferirlos al tubo con reactivo C, tapar e invertir 10 veces para mezclar y dejar reaccionar durante 5 minutos. Una vez pasado este tiempo llevar a leer al espectrofotómetro UV-Vis (Perkin Elmer®, modelo Lambda 365) previamente calibrado. La cuantificación del nitrógeno total se calculó a través de la ecuación de la recta obtenida de una curva de calibración previamente preparada en un intervalo de trabajo de 24 a 120 mg L⁻¹.



Figura 10. Prueba de nitrógeno total para las diferentes muestras de mono-digestión o co-digestión en reactor en lote o en un reactor anaerobio de flujo ascendente.

Sólidos Totales, Sólidos Totales Volátiles y Sólidos Suspendidos Totales

Para la determinación de estos parámetros se hicieron bajo la NMX-034-SCFI-2015 [108]. Para los ST se colocaron 20 mL de muestra homogeneizada a una cápsula de porcelana tarada previamente, esto se lleva a una estufa (Thermo Scientific®, modelo Heratherm Oven) a la temperatura de 105 °C ± 2 °C dejándose durante 24 h para la evaporación, después se llevó a peso constante. Teniendo el peso constante esta misma cápsula es llevada a una mufla (Thermo Scientific®, modelo Linderbeg M) a la temperatura de 550 °C ± 50 °C para llevar a calcinación toda la materia orgánica durante 2 horas, posterior a ello se lleva a peso constante. Con respecto a los SST se tomaron 3 mL de la muestra previamente homogeneizada para ser filtrado a vacío en un crisol Gooch pretarado, después de la filtración se lleva a la estufa a una temperatura de

105 °C \pm 2 °C dejándose durante 24 h para la evaporación, después se llevó a peso constante. Al finalizar el análisis se lleva a cabo los cálculos de acuerdo a la norma.

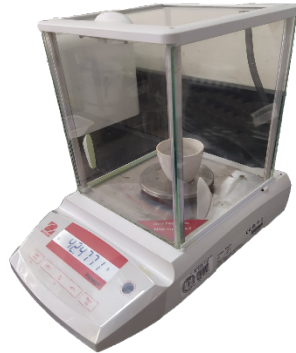


Figura 11. Imagen de balanza analítica usada para la prueba de sólidos totales para las diferentes muestras de mono-digestión o co-digestión en reactor en lote o en un reactor anaerobio de flujo ascendente.

3.4 Fermentación oscura en sistema tipo lote

3.4.1 Diseño de experimentos para las co-digestiones en el sistema tipo lote

Con la finalidad de evaluar las ventajas de los sustratos en las co-digestiones, se diseñaron mezclas HS-SS y HS-HL con relaciones C/N en el intervalo de 20 a 40. De acuerdo con varios autores, las co-digestiones en este intervalo tienen capacidad de amortiguar las reacciones microbianas además de proveer los nutrientes necesarios para el proceso. En este trabajo se utilizó un diseño experimental factorial 2^2 con punto central, de lo cual se obtienen 6 tratamientos que son mostrados en la **Tabla 2**. Teniendo como factor de respuesta la producción de biogás.

Tabla 2. Diseño experimental para la evaluación en microrreactores tipo lote de las co-digestiones HS-SS y HS-HL.

Número de corridas	Sustrato	Relación C/N
1	HS - SS	20
2	HS - HL	20
3	HS - SS	40
4	HS - SS	30
5	HS - HL	30
6	HS - HL	40

3.4.2 Preparación del sistema para el proceso de fermentación oscura en el sistema de reactores tipo lote

Terminada la caracterización fisicoquímica para cada co-digestión (HS-SS y HS-HL), se procedió a preparar las mezclas de las diferentes co-digestiones, según el volumen de sustratos correspondientes a la relación C/N (20, 30 y 40). Se midieron los volúmenes de los sustratos con una probeta según la relación C/N de interés y se mezclaron en un recipiente para garantizar la homogeneidad con una licuadora (Blender HGBSS®, modelo HPBSGYP4), enseguida la mezcla se pasó a través de un colador malla 40/60 mesh para evitar algún sólido. A partir de la co-digestión, se prepararon los sistemas tipo lote (con 6 réplicas cada uno) como se muestra en la **Figura 13**, el cual fue desarrollado en botellas de vidrio tipo antibiótico de 124 mL. El volumen de trabajo de los reactores fue de 90 mL y consistió de 70 mL de la co-digestión (HS-SS o HS-HL). Al reactor también se le adicionó 10 mL de lodo granular anaerobio pretratado térmicamente para ambas

co-digestiones, es importante destacar que en este punto se ajustó el pH del medio a 6 usando NaOH 0.1 N y se completó el volumen del reactor con una disolución de nutrientes adaptada [20] cuya composición consiste en 0.5 g L⁻¹ de NH₄Cl, 0.25 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0.25 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 0.3 g L⁻¹ de MgCl₂•6H₂O, 0.025 g L⁻¹ de FeCl₃, 0.016 g L⁻¹ de NiSO₄, 0.025 g L⁻¹ de CoCl₂•6H₂O y 0.05 g L⁻¹ de ZnCl. Finalmente, los reactores se sellaron con tapones de goma de neopreno y cubierta de aluminio con la finalidad de evitar fugas de biogás en los reactores. Para completar la operación, los reactores fueron colocados en una incubadora (Thermo Scientific®, modelo Max 400) bajo variables fijas de temperatura (35 °C) y de agitación (50 RPM) por un periodo de 48 h.

En la primera ronda experimental se evaluó la co-digestión de agua residual de la industria de panificación con suero de queso (HS-SS) y la segunda ronda se evaluó la co-digestión de agua residual de la industria de panificación con lodo primario (HS-HL). Además de la preparación de los reactores para las co-digestiones también fueron preparados controles individuales (mono-digestiones) para los tres tipos de sustratos sin inóculo SS, HS Y HL.

A partir de las réplicas de cada co-digestión, se le dio seguimiento a la reacción cada cuatro horas hasta el término de la ronda experimental. Además de la caracterización fisicoquímica de las co-digestiones por pH, CH, DQO, ST, STV, SST (utilizando la misma metodología descrita en el apartado 3.3), se midió la producción de biogás empleando el método de desplazamiento de agua y se hizo el análisis por cromatografía de gases para la cuantificación de hidrógeno y ácidos grasos volátiles que se describe en la siguiente sección.

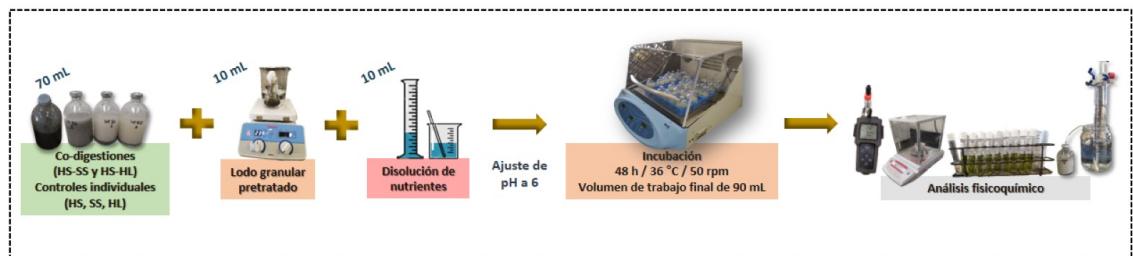


Figura 12. Representación general para la preparación de los microrreactores en el sistema tipo lote para las co-digestiones HS-SS, HS-HL y para las mono-digestiones HS, SS Y HL.

3.5 Monitoreo del biogás y análisis por cromatografía de gases

3.5.1 Análisis de biogás

El volumen de producción de biogás para el sistema tipo lote y el sistema tipo continuo se midió con el método de desplazamiento de agua utilizando una jeringa conectada a una manguera la cual fue colocada en el interior de una probeta llena de agua que es invertida y sumergida en un recipiente con agua donde se puede observar el desplazamiento del agua en el interior de la probeta debido al gas producido en los microrreactores [20].



Figura 13. Medición de biogás por el método de desplazamiento de agua para las diferentes muestras de mono-digestión o co-digestión en reactor en lote o en un reactor anaerobio de flujo ascendente.

3.5.2 Análisis por cromatografía de gases

Con la finalidad de conocer la composición del biogás como el hidrógeno y el dióxido de carbono principalmente así como la generación de metabolitos solubles tales como los Ácidos Grasos Volátiles (ácido acético, ácido propiónico, ácido fórmico, ácido butírico, ácido valérico) generados a través de la co-digestión de los sustratos en los reactores para ambos sistemas (tipo lote y continuo), se utilizó la técnica de cromatografía de gases usando para ello el cromatógrafo de marca Agilent Technologies®, modelo 7820A. Para la cuantificación de los gases permanentes (hidrógeno y dióxido de carbono), el cromatógrafo se acopló al detector de conductividad térmica (TCD por sus siglas en inglés) y se utilizó una columna capilar de sílice fundida Carboxen 1006 (3 m x 0.53 mm, marca SUPELCO®), las condiciones de temperatura para el inyector y el detector fueron fijadas a 230 °C, la temperatura del horno fue isotérmica a 40 °C, empleando argón como gas acarreador. Para la cuantificación de los gases en cada muestra, las muestras se

obtuvieron a partir de la extracción manual del biogás en el interior del microrreactor o en el reactor por medio de una jeringa de vidrio de 500 μL , que posteriormente es inyectada de manera manual en el puerto de inyección [29]. La adquisición y procesamiento de datos se realizó con el software OpenLAB Control Panel.

Para la cuantificación de Ácidos Grasos Volátiles (AGV's) se tomaron 2 mL de la parte líquida previamente homogeneizada de cada microrreactor o reactor y se pasaron a microtubos eppendorf de 2 mL para ser centrifugados a 10,000 rpm por 10 min en una centrifuga (Thermo Scientific®, modelo Sorvall ST 16/16R) [104], posterior a ello el sobrenadante es tomado con una jeringa para filtrarlo a través de unos discos con membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0.45 μ de tamaño de poro, posteriormente este filtrado es almacenado y sellado en viales ámbar de 2 mL para ser colocados en el automuestreador y llevarse a analizar en el cromatógrafo de gases (Agilent Technologies®, modelo 7820A) acoplado con el detector de ionización a la flama (FID por sus siglas en inglés), utilizando la columna INOWAX y argón como gas acarreador. Para las condiciones de temperatura se empleó una rampa de calentamiento de 70 a 180 $^{\circ}\text{C}$ para el horno, con una velocidad de calentamiento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, y una temperatura de 250 $^{\circ}\text{C}$ para el inyector y el detector. La adquisición y procesamiento de datos se realizó con el software Agilent OpenLAB Control Panel.



Figura 14. Imagen de cromatógrafo de gases marca Agilent usado para la cuantificación de hidrógeno, dióxido de carbono, ácidos grasos volátiles por cromatografía de gases para las diferentes muestras de mono-digestión o co-digestión en reactor en lote o en un reactor anaerobio de flujo ascendente.

3.6 Cinética del proceso de producción de hidrógeno

3.6.1 Modelo Gompertz modificado

Los modelos cinéticos como el de Gompertz se utiliza como modelo matemático para validar/describir el progreso de producción de biogás en la fermentación oscura. La ecuación del modelo de Gompertz ha sido modificada para acomodar la cinética típica de la degradación del sustrato, crecimiento de la biomasa y la producción de biogás [111]. El modelo está adaptado para describir el progreso acumulativo de hidrógeno en un experimento tipo lote y es expresado en la **Ecuación 3**.

$$B(t) = B_{m\acute{a}x} * \left[- \exp \left(\frac{2.71828 * R_{m\acute{a}x}(\lambda - t)}{B_{m\acute{a}x}} + 1 \right) \right] \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde:

$B(t)$ (mL) es el volumen de biogás producido a un tiempo t (h)

$B_{m\acute{a}x}$. (mL) es la producción máxima acumulada de biogás

$R_{m\acute{a}x}$. (mL h⁻¹) es la velocidad máxima de producción de biogás

λ (h) es el tiempo de fase de latencia

3.7 Escalamiento de la co-digestión

A partir de la fase experimental en el sistema tipo lote se permitió conocer bajo qué condiciones operar y la elección del sistema de co-digestión (HS-SS) para llevarlo a un sistema tipo continuo como a continuación se presenta.

3.7.1 Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente (RAFA)

El escalamiento de la fermentación oscura se llevó a cabo en un reactor anaerobio de flujo ascendente (RAFA) tipo artesanal. Para ello se utilizaron cilindros de acrílico (300 mm de altura por 90 mm de diámetro) obteniendo un volumen total de 1.6 L, sin embargo, el volumen de trabajo final fue de 1.2 L. El influente del reactor se ubicó en la parte inferior y sobre la línea se colocó una válvula ON-OFF para darle seguridad a la alimentación del RAFA, que se realizó a través de una bomba peristáltica (modelo Daigger) y que sirve como medio para regular el flujo volumétrico según el TRH del experimento (3, 8 y 12 h) como se muestra en la **Figura 14**. En la parte superior del reactor se encuentra la línea de salida que permite tomar muestra del efluente, así como la medición del biogás por el método de desplazamiento del agua. El inóculo granular pretratado térmicamente representando el 10% del volumen de trabajo del reactor, fue colocado al fondo del reactor en contacto con la co-digestión fresca. Para promover el crecimiento microbiano, al inicio de la operación del reactor alimentado con 120 mL de una disolución de nutrientes de la misma composición que la descrita en el sistema tipo lote (apartado 3.4.2).

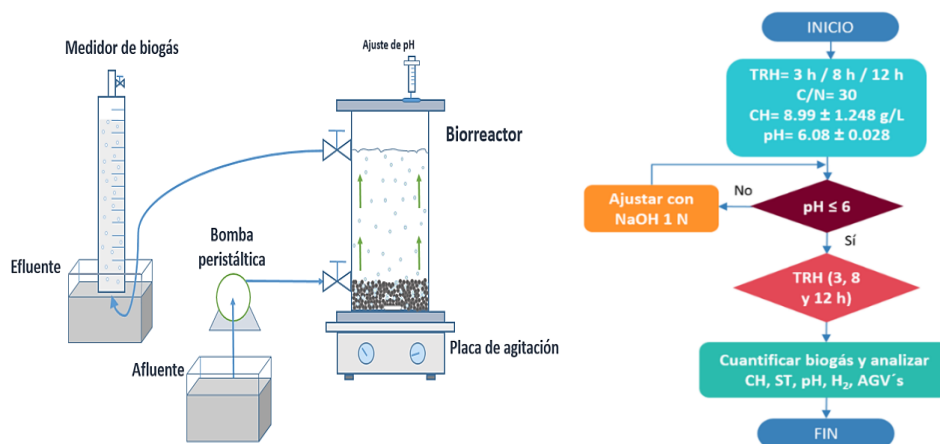


Figura 15. Representación esquemática del reactor anaerobio de flujo ascendente de 1.2 L de volumen de trabajo operado sin platos, así también se muestra la representación de un diagrama de flujo de operación.

Las condiciones de operación del reactor fueron con la co-digestión HS-SS a pH constante de 5.5 en el afluente, relación C/N 30 y tiempo de retención hidráulico de 3, 8 y 12 h. La caracterización fisicoquímica de la co-digestión inicial y durante la reacción de fermentación oscura, así como los productos de la reacción en fase gas y líquida durante los diferentes ciclos (TRH 3, 8 y 12 h) se caracterizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en las secciones 3.3 y 3.5.

3.7.2 Reactor Anaerobio Híbrido de Flujo Ascendente (RAHFA)

Para el caso del RAHFA, se utilizó el mismo sistema experimental descrito en la sección anterior, la diferencia es que en este sistema está colocada una estructura de platos donde se añadió el mismo volumen de inóculo en la dirección longitudinal del reactor de manera a garantizar una mejor distribución (véase **Figura 15**).

Se operaron estos reactores utilizando la co-digestión de agua residual HS-SS, se optó por trabajar con la relación C/N 30 a temperatura ambiente y a pH constante siendo ajustado con NaOH 1N debido a que el sustrato tendía a acidificarse con el paso del tiempo, también de igual manera se evaluaron los tres TRH de 3, 8 y 12 h.

La caracterización fisicoquímica del RAHFA antes y después de la reacción se hicieron con los procedimientos descritos en las secciones 3.3 y 3.5. Sin embargo, habrá que destacar que con esta configuración fue posible operar el reactor hasta una cantidad de 50 ciclos para el TRH 8 h y 30 ciclos para los TRH de 3 y 12 h.

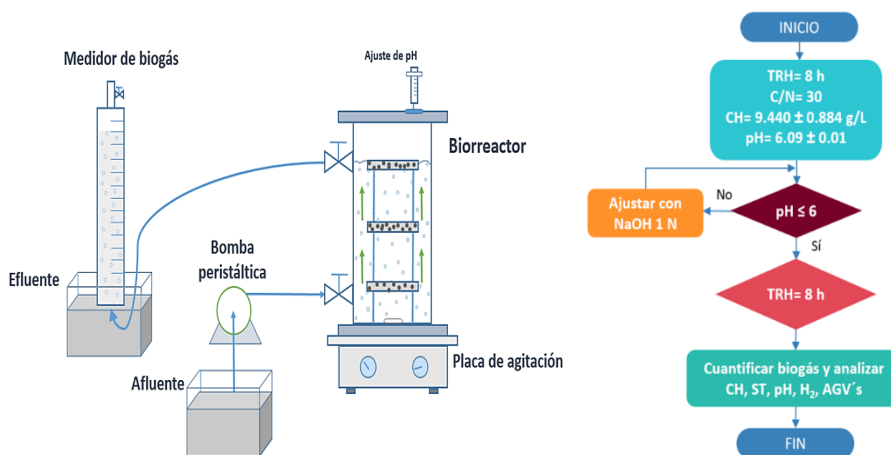


Figura 16. Representación esquemática del reactor híbrido anaerobio de flujo ascendente de 1.2 L de volumen de trabajo operado con platos, así también se muestra la representación de un diagrama de flujo de operación.

3.8 Rendimiento y tasa de producción volumétrica del hidrógeno

Con respecto al **rendimiento del hidrógeno**, este fue calculado por las siguientes ecuaciones, utilizando la **Ecuación 4** para la obtención de mL de hidrógeno y posteriormente con la **Ecuación 5** obtener el rendimiento del hidrógeno (HY por sus siglas en inglés).

$$\text{Volumen de hidrógeno} = \frac{\left(\text{Vol. biogás} * \left(\frac{\%H_2}{100} \right) * P * 273.15 \right)}{T + 273.15} \text{ (Ec. 4)}$$

Donde:

Volumen de hidrógeno son los mL obtenidos en la fermentación oscura

Voumen de biogás es el volumen obtenido en el ciclo

$\%H_2$ concentración de hidrógeno obtenida por cromatografía de gases

P presión atmosférica (1 atm)

T temperatura

$$HY = \frac{\text{mL Hidrógeno}}{\text{g DQO}} \text{ (Ec. 5)}$$

Donde:

HY es el rendimiento del hidrógeno

mL hidrógeno son los mL obtenidos en la fermentación oscura

g DQO es la diferencia de DQO ($DQO_{\text{inicial}} - DQO_{\text{final}}$)

Con respecto a la **tasa de producción volumétrica del hidrógeno** (VHPR por sus siglas en inglés), este fue calculado utilizando la **Ecuación 6**.

$$VHPR = \frac{mL \text{ Hidrógeno}}{Vol. Reactor * día} \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde:

VHPR es la tasa de producción volumétrica del hidrógeno

mL hidrógeno son los mL obtenidos en la fermentación oscura

Vol. reactor es la cantidad total del volumen en el reactor

Día equivalente a las 24 h

3.9 Evaluación de los parámetros de desempeño del método analítico para la cuantificación de hidrógeno y ácidos grasos volátiles

Con la finalidad de cuantificar los gases de la FO como el hidrógeno que es el principal analito de medición en la producción de biogás, así como otros metabolitos secundarios como los ácidos grasos volátiles se llevó a cabo una evaluación de parámetros de desempeño del método analítico por cromatografía de gases, siendo la cromatografía de gases una técnica versátil por la capacidad de analizar muestras líquidas, vapores o gases introducidas en los puertos de inyección, donde la mezcla se volatiliza para ser arrastrada por un gas inerte hacia una columna que hace posible la separación de los componentes por el grado de interacción entre la muestra y la columna, finalmente siendo detectados y cuantificados por diferentes detectores [112, 113]. El cromatógrafo de gases acoplado con detector de conductividad térmica (TCD por sus siglas en inglés) se utiliza comúnmente para medir H_2 , CO_2 , CO y CH_4 , otro tipo de detector acoplado al cromatógrafo es el de ionización a la flama (FID por sus siglas en inglés) adecuado para la medición de ácidos grasos volátiles, entre otros compuestos [114].

Hoy en día la toma de decisiones se da en base a resultados válidos, obtenidos por su reproducibilidad determinadas cuidadosamente, lo que genera una necesidad por obtener resultados comparables y fiables. Siendo cada vez más aprobado por la inclusión de normas y sistemas de calidad de las mediciones, por la acreditación de laboratorios bajo la norma ISO/IEC 17025 en la cual la validación, verificación o evaluación de parámetros de desempeño de un método son componentes esenciales de las mediciones para producir datos analíticos fiables [114, 115], formando parte de las garantías de calidad que permiten proporcionar resultados analíticos de alta calidad [116].

Para ello el laboratorio debe hacer la verificación del desempeño de los métodos analíticos para la cuantificación de los analitos y evidenciar si cumple con las características de desempeño, la evaluación de los parámetros de desempeño del método comprende la linealidad, la precisión e incertidumbre que son definidos de la siguiente manera [117]:

La **linealidad** (intervalo analítico) es definida como la capacidad del método para proporcionar resultados que son proporcionales a la concentración de la muestra dentro de un

intervalo proporcionado. Este término en el contexto para un método analítico hace referencia al intervalo de concentraciones del analito donde la respuesta del sistema de medición es lineal cuya representación gráfica es obtenida por la ecuación de la recta la cual debe exhibir una buena correlación de los puntos experimentales para que sea aceptado [115, 118].

La **precisión** es definida como el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos al utilizar una muestra homogénea y bajo condiciones establecidas [115].

La **veracidad** es definida como la concordancia entre la media aritmética y el valor verdadero o aceptado como referencia, relacionado con los errores de tipo sistemático, también conocido como sesgo [115].

La **incertidumbre de medición** es definida como el parámetro que se asocia al resultado de una medición, caracterizando la dispersión de valores que pueden ser atribuidos al mensurando [115].

3.9.1 Medición de hidrógeno y ácidos grasos volátiles

Para la cuantificación de hidrógeno se preparó la curva de calibración estableciendo un rango de concentraciones siendo este el rango de trabajo, a partir de mezclas de gases proporcionados en tanques (marca INFRA®) cuyo contenido representó el 10, 20 y 30%, estas mezclas son mostradas en la **Tabla 3**. La inyección fue de manera automática por tener una línea conectada al tanque correspondiente hacia el puerto de inyección del cromatógrafo, minimizando pérdidas de gas en comparación de inyección manual. Las condiciones de operación son mostradas en la **Tabla 4** que se muestran a continuación:

Tabla 3. Contenido de los tanques para la curva de calibración del hidrógeno.

Mezcla inflamable	Mezcla inflamable	Mezcla inflamable
10% CO	20% CO	15% CO
10% CH ₄	20% CO ₂	15% CH ₄
10% H ₂	20% CH ₄	30% H ₂
Balance N ₂	10% H ₂	Balance CO ₂
	Balance N ₂	

Tabla 4. Condiciones analíticas del CG-FID para la cuantificación de hidrógeno.

Equipo	CG Agilent 7820 A
Detector	Conductividad Térmica (TCD)
Columna	Capilar, Carboxen 1006, SUPELCO (3 m x 0.53 mm)
Gas acarreador	Argón
Temperatura	Horno a 40 °C Inyector a 230 °C Detector a 230 °C
Tiempo total de análisis	15 min

Todos los datos que se obtuvieron de la medición por CG-FID fueron utilizados para la evaluación de los parámetros de desempeño del método analítico. Los parámetros para la evaluación (linealidad, Límite de Detección (LOD), Límite de cuantificación (LOQ)) fueron calculados de acuerdo procedimientos reportados en literatura [115, 116]. Para ello se inyectó una curva de calibración y fue calculado utilizando la metodología de los mínimos cuadrados según Miller N.J. & Miller, J.C. (2002) [119].

De igual manera para la cuantificación de los AGV's se preparó una curva de calibración estableciendo un rango de concentraciones siendo este el rango de trabajo, a partir de una mezcla líquida de AGV's (marca SUPELCO, Lote: XA17116V) que contenía los analitos de interés con una concentración de 10 mMol (ácido acético, ácido propiónico, ácido fórmico, ácido butírico y ácido valérico), elaborando una curva de calibración de 1 mM a 10 mM como concentración, siendo calculado como en el caso del hidrógeno con la metodología de los mínimos cuadrados, evaluando los mismos parámetros como en la medición de hidrógeno. La inyección de los puntos de calibración fue de manera automática por el automuestreador, las condiciones de operación se muestran en la **Tabla 5** que son presentadas a continuación:

Tabla 5. Condiciones analíticas del CG-FID para la cuantificación de hidrógeno.

Equipo	CG Agilent 7820 A
Detector	Ionización a la Flama (FID)
Columna	HP-INNOWax, Agilent (PEG), (50 m x 0.20 mm x 0.4 µm)
Gas acarreador	Argón
Temperatura	Horno, rampa de calentamiento de 70 a 180 °C con velocidad de calentamiento de 10 °C min ⁻¹ . Inyector a 250 °C Detector a 250 °C
Tiempo total de análisis	30 min

3.10 Incertidumbre

El análisis químico tiene gran importancia ya sea para la toma de decisiones en la industria química o para las áreas de investigación, por lo que esto conlleva a contar con resultados confiables que permitirán la más adecuada toma de decisión. Es por ello que varias organizaciones internacionales como la ISO (International Organization for Standardization) plantean la incertidumbre como parámetro de medición para la determinación de confianza para los laboratorios [120]. La incertidumbre es definida como el parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando. Se compone de contribuciones de diversas fuentes, algunas de ellas descritas por las magnitudes de entrada [121].

En la **Figura 17** se presenta un diagrama de causa y efecto de las variables como fuentes involucradas para la concentración del hidrógeno (%). Para la parte de incertidumbre individual se tomaron como fuente la preparación de los sustratos, preparación de inóculo, preparación de reactivos y por último la medición de la muestra. Estas incertidumbres individuales se utilizaron para calcular la incertidumbre combinada la cual permitirá obtener finalmente la incertidumbre expandida.

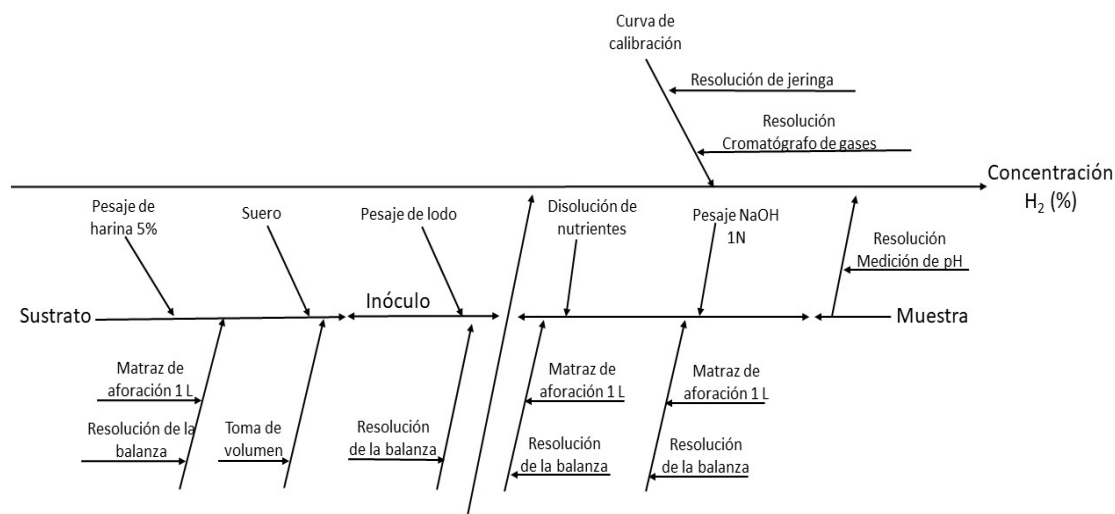


Figura 17. Diagrama de causa y efecto de las variables involucradas para la determinación de la incertidumbre en la cuantificación de la concentración del hidrógeno (%).

Una vez determinado el mensurando, el método y el procedimiento de medición, se identifican las posibles fuentes de incertidumbre que fueron presentadas anteriormente en el diagrama de causa y efecto [121].

3.10.1 Desarrollo y cálculo de la incertidumbre

En la literatura se han distinguido dos métodos principales para la cuantificación de las fuentes de incertidumbre, siendo el *Método de Evaluación Tipo A* basado en análisis estadístico de una serie de mediciones y por otro lado el *Método de Evaluación Tipo B* que involucra información externa u obtenida por experiencia, ya sea a través de certificados de calibración, manuales de los instrumentos de medición, normas, literatura, valores de mediciones anteriores o conocimiento sobre características o del comportamiento del sistema de medición [121].

En este caso fue se utilizaron ambos métodos, el A por pesajes y a través determinar la desviación estándar y la B por la información obtenida por los instrumentos, además la cuantificación de la fuente de incertidumbre incluye la asignación de un valor y la determinación de la distribución a la cual refiere este valor, tomando en cuenta la *Distribución rectangular b*, por obtenerse datos a través de la resolución de instrumentos digitales o a partir de la información técnica sobre tolerancias de un instrumento, debido que en este trabajo se trabajó con instrumentos digitales [121].

Para ello se comienza a calcular **las incertidumbres individuales**, para ello se incluyeron el pesaje de los sustratos, el pesaje de lodo granular, pesaje de disolución de nutrientes y disoluciones para ajuste de pH que en este caso fue NaOH 1N. Se tomó en cuenta la resolución de la balanza analítica para la incertidumbre individual, además del material volumétrico como matraz de aforación cuyos valores se tomaron de una Guía Técnica sobre Trazabilidad Metrológica e Incertidumbre, con respecto a los pesajes se sacó la desviación estándar, así como la raíz cuadrada de la cantidad de pesaje [122]. Utilizando la **Ecuación 7** para la evaluación tipo A y la **Ecuación 8** para la evaluación tipo B.

$$u(x_i) = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde:

$u(x_i)$ es la incertidumbre estándar

SD es la desviación estándar de la cantidad de pesaje

n es el número de muestras

$$u(x_i) = \frac{a}{2\sqrt{3}} \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde:

$u(x_i)$ es la incertidumbre estándar

a es la resolución del instrumento digital

Una vez calculadas las incertidumbres estándar se procede a calcular la incertidumbre combinada, siendo este el resultado de la combinación de las contribuciones de las fuentes a partir de la **Ecuación 9**.

$$u_y = \sqrt{\sum [c_i * u(x_i)]^2} \quad (\text{Ec. 9})$$

Donde:

u_y es la incertidumbre combinada de la concentración del hidrógeno

$u(x_i)$ es la incertidumbre estándar de la magnitud de influencia evaluada

c_i es el coeficiente de sensibilidad con valor de 1

Una vez calculada la incertidumbre combinada se procede a calcular la incertidumbre expandida bajo un factor de cobertura (k) de 2 correspondiendo a un grado de confiabilidad del 95,45 %, a partir de la **Ecuación 10**, donde el factor de cobertura es un factor numérico utilizado como un multiplicador de la incertidumbre estándar combinada para obtener la incertidumbre expandida (123)

$$U_y = u_c * k \quad (\text{Ec. 10})$$

Donde:

U_y es la incertidumbre expandida de la concentración del hidrógeno

u_c es la incertidumbre combinada

k es el factor de cobertura

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados y discusión

En el presente capítulo se muestran los resultados más relevantes obtenidos durante la fase experimental, por medio de tablas, gráficas, figuras según corresponda el caso. La primera parte experimental consistió en la caracterización individual de cada sustrato para identificar y diseñar las co-digestiones utilizando agua residual de la industria de panificación con suero de queso (HS-SS) y agua residual de la industria de panificación con lodo primario (HS-HL). A partir de la caracterización fisicoquímica, en particular de carbohidratos totales y nitrógeno total se calculó la relación volumen de cada sustrato para preparar las co-digestiones (HS-SS y HS-HL) con las relaciones C/N 20, 30 y 40, como inóculo lodo granular, a 35 °C y pH= 6.0 ± 0.1. A partir de lo anterior, en la segunda parte del trabajo se realizó un diseño de experimentos 2², involucrando las variables antes mencionadas y posteriormente se ejecutó experimentalmente con la finalidad de favorecer el crecimiento de los microorganismos favorecedores en la producción de hidrógeno y calcular el correspondiente rendimiento.

En base a los resultados de rendimiento (0.0043 ± 0.0004 mL H₂ gSTV⁻¹ _{removido}) para la co-digestión HS-SS se seleccionó este experimento (relación C/N 30, a 35 °C y pH_{inicial}= 6.0 ± 0.1) como la co-digestión adecuada para implementar la fermentación oscura en un reactor anaerobio de flujo ascendente y en un segundo reactor (diseñado en el grupo de investigación de la Facultad de Ingeniería Ambiental de la UANL) denominado reactor híbrido de flujo ascendente a los tiempos de retención hidráulico de 3, 8 y 12 h. A partir del seguimiento del desempeño de ambos reactores (análisis fisicoquímicos, biogás y ácidos grasos volátiles) se observó que el segundo reactor fue estable a los diferentes TRH por al menos 30 ciclos, destacando que el TRH 8 h fue el que presentó un rendimiento de 266.84 mL H₂ gSTV⁻¹ _{removido}. Finalmente, se presenta un análisis de casos de los diferentes parámetros involucrados en el análisis cromatográfico de los analitos (hidrógeno y ácidos grasos volátiles); evaluación de parámetros de desempeño del método analítico por cromatografía de gases comprendiendo la linealidad, precisión, veracidad e incertidumbre de la medición.

4.2 Caracterización fisicoquímica de los sustratos

En la **Tabla 6** se presenta la caracterización fisicoquímica de los sustratos SS, HS y HL utilizados para la preparación de las dos co-digestiones estudiadas en este trabajo.

Tabla 6. Caracterización fisicoquímica de sustratos empleados en el diseño de las co-digestiones HS-SS y HS-HL.

Parámetros	Sustratos		
	(SS)	(HS)	(HL)
pH (Unidades de pH)	6.31 ± 0.04	5.43 ± 0.03	7.65 ± 0.01
CT (g L ⁻¹)	33.67 ± 5.43	10.40 ± 0.01	4.10 ± 0.06
NT (g L ⁻¹)	1.266 ± 0.13	0.15 ± 0.00	4.50 ± 0.00
DQO (g L ⁻¹)	93.97 ± 84.00	18.85 ± 0.01	8.44 ± 0.17
ST (g L ⁻¹)	66.65 ± 0.66	40.70 ± 0.80	30.99 ± 0.69
STV (g L ⁻¹)	61.52 ± 0.71	38.84 ± 1.35	16.65 ± 1.14
SST (g L ⁻¹)	-	29.78 ± 0.78	26.54 ± 1.54

Los resultados de la caracterización fisicoquímica obtenidos para el SS no presentaron gran variación a los reportados por De Gionannis *et al.*, en este estudio se obtuvieron valores de pH de 6.31 ± 0.04 , para los ST alrededor de 66.65 ± 0.66 g L⁻¹, para STV de 61.52 ± 0.71 g L⁻¹, sin embargo el que tuvo diferencia significativa fue para el nitrógeno total con un valor de 1.266 ± 0.13 g L⁻¹, mientras que el reportado por Gionannis *et al.* fue de 0.94 ± 0.2 g L⁻¹, presentando más de 10 veces el contenido de nitrógeno en el suero de queso para este proyecto [21]. Por otro lado, Cruz Méndez reportó valores entre 1.32 a 1.55 ± 0.00 g L⁻¹, coincidiendo a lo reportado en este trabajo. Para este sustrato, habrá que destacar la variabilidad del pH del SS con el paso del tiempo, debido a su capacidad de acidificación coincidiendo con lo reportado por Cruz Méndez [29], correspondiendo esta acidez a la producción de ácido láctico a partir de la lactosa por las bacterias lácticas.

Otro sustrato utilizado es el HL cuyas características fisicoquímicas no variaron con respecto a lo reportado por Reyna Gómez *et al.*, destacando que los valores de pH se encontraron cercanos a 7 como en el caso del lodo que utilizó Yang G. [20, 124]. Finalmente, la caracterización del HS fue el sustrato que presentó el pH y el NT más bajo (pH= 5.43 ± 0.03 y NT= 0.15 ± 0.00 g L⁻¹). La tendencia en pH ácido también se observó en el trabajo de Tawfik *et al.*, quien reportó un valor de 4.2 ± 0.1 en agua residual de producción de galletas [125]. En la misma sintonía, Struk-Sokolowska (2018) mencionó que las panaderías generan grandes cantidades de agua residual ácida por contener harina, grasa, azúcar, mantequilla, cepas de levadura que representa el proceso mientras que el resto del agua proviene del lavado de maquinaria, contenedores y suelo

[126]. Para este trabajo la DQO se cuantificó en $18.85 \pm 0.01 \text{ mg L}^{-1}$ del sustrato y que son cercanos a los valores reportados por de Tawfik *et al.* (2020) con $10.4096 \pm 6.6117 \text{ g L}^{-1}$, y por su magnitud son atractivos para la degradación de la materia orgánica [125]. Dado que el contenido de nitrógeno del sustrato HS, fue el más bajo de los tres sustratos en estudio en este trabajo, se decidió considerar a esta corriente como la fuente de carbohidratos mientras que el SS y el HL se consideran fuente de nitrógeno y de esta manera se permiten establecer las relaciones C/N 20, 30 y 40 en las co-digestiones de HS-SS y HS-HL.

4.3 Caracterización de mono-digestiones y co-digestiones HS-SS y HS-HL en el sistema tipo lote

Medición de potencial de hidrógeno (pH)

En la **Figura 18** se presenta la evolución del pH dentro de las primeras 24 h de la FO de 48 h en el sistema tipo lote para la co-digestión (HS-SS) empleando las tres relaciones C/N 20, 30 y 40, además de los resultados de las mono-digestiones o de los sustratos individuales. Todos los reactores fueron inoculados con lodo granular pretratado térmicamente para la inhibición de bacterias metanógenas o bacterias consumidoras de hidrógeno, operados a 35°C con una agitación de 50 RPM a pH inicial de 6.0 ± 0.1 . En el caso de las co-digestiones se logró observar una disminución de pH hasta 5.5 ± 0.1 dentro de las primeras 8 h en el siguiente orden de pH (C/N 40) > pH (C/N 30) > pH (C/N 20), y evidenciando que la relación C/N 20 fue la que mayor acidificación (pH 4) presentó en 24 h, por tener un mayor contenido en volumen de suero al preparar la co-digestión en comparación con las otras dos relaciones C/N. En el caso de las mono-digestiones, se observó una tendencia similar, el sustrato SS presentó una acidificación brusca en el reactor (pH \approx 4) a partir de 8 h mientras que el sustrato HS se mantuvo una unidad de pH superior. A partir de lo anterior, queda evidenciado que los co-digestiones con mayor contenido de carbohidratos amortiguan las rutas metabólicas (acidogénesis y acetogénesis) de la FO no así los reactores que contenían un mayor volumen de suero de queso, así como también es evidenciada la importancia de la sinergia de los sustratos para el amortiguamiento de pH, encontrándose en los extremos los valores de pH para los sustratos individuales. El conjunto de resultados coincide con lo reportado recientemente el grupo de investigación.

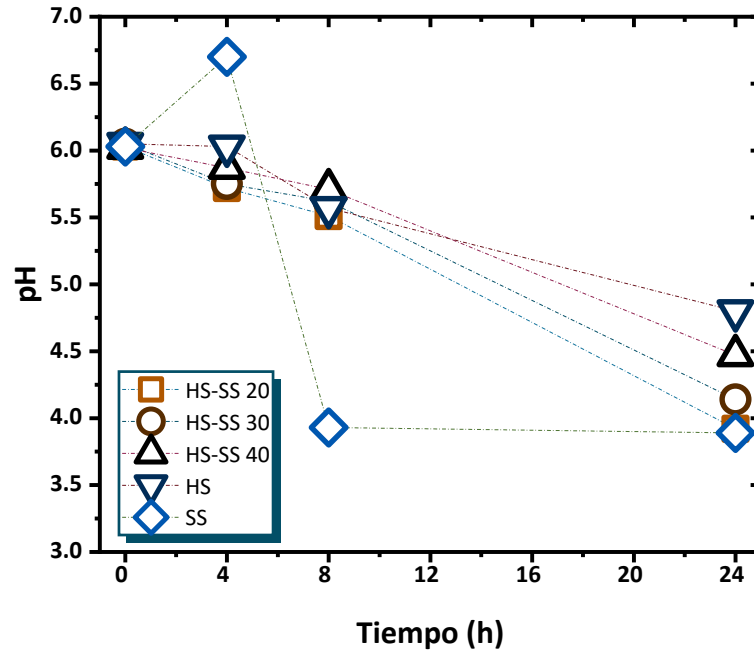


Figura 18. Medición de pH de la co-digestión (HS-SS) empleando tres relaciones de C/N (20, 30 y 40) y las respectivas mono-digestiones HS (C/N 72) y SS (C/N 86) empleando inóculo granular, pH= 6.00 ± 0.10, T= 35 °C, 50 RPM durante 24 h.

En la **Figura 19** se presentan los resultados de la evolución de pH para la co-digestión HS-HL y sus correspondientes mono-digestiones HS y HL. Para las tres co-digestiones (C/N 20, 30 y 40) se observó un ligero incremento del pH en las primeras 4 h para posteriormente disminuyó el pH de los reactores hasta 4.5-4.7 ± 0.02 en 24 h. Sin embargo, con el seguimiento de este parámetro no se identificó una variación importante del pH asociado con los lodos primarios, sobre todo porque al comparar los resultados de las co-digestiones (C/N 20, 30 y 40) con la mono-digestión HS-I, las co-digestiones HS-HL presentaron variaciones mínimas de pH a lo largo del tiempo. Por lo tanto, para esta serie de experimentos es difícil inferir si las rutas metabólicas son diferentes. Finalmente, en la mono-digestión HL el pH se mantuvo por arriba de 6 durante las 24 h posiblemente asociada a la baja actividad microbiana en comparación al SS.

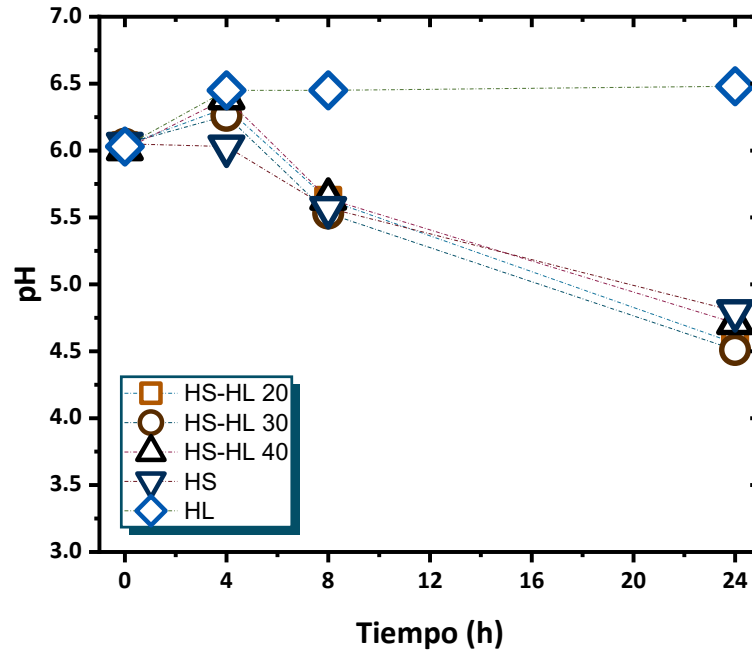


Figura 19. Medición de pH de la co-digestión (HS-HL) empleando tres relaciones de C/N (20, 30 y 40) y las respectivas mono-digestiones HS (C/N 72) y HL (C/N 1) empleando inóculo granular, pH= 6.0 ± 0.1, T= 35 °C, 50 RPM durante 24 h.

Producción de biogás

En la **Figura 20** se presentan los resultados de la medición de la producción de biogás en el sistema tipo lote de la co-digestión (HS-SS) durante 24 h. En la gráfica se observa que la máxima producción de biogás para las diferentes co-digestiones HS-SS fue de 60 mL para la relación C/N 40, seguido por 57 mL para C/N 30 y finalmente 55 mL para la relación C/N 20. En el caso de las mono-digestiones el reactor con el sustrato SS produjo 88 mL de biogás mientras que el reactor con el sustrato HS solo produjo aproximadamente la mitad (47 mL). A partir de lo anterior, las co-digestiones produjeron menor cantidad de biogás respecto a SS, este comportamiento fue observado en la co-digestión de Humberto *et al.* al trabajar lactosuero con estiércol bovino fresco que al trabajar con el lactosuero como mono-digestión (a 35 °C, pH a 6), siendo que ellos trabajaron para la producción de metano [126]. Este comportamiento se atribuye a que la mezcla de sustratos amortigua la actividad microbiana de los reactores en la FO coadyuvando a que las reacciones de acetogénesis y acidogénesis trascurren relativamente lentas dando lugar a la producción de hidrógeno. Este resultado coincide con lo observado en otras co-digestiones en el

intervalo de relaciones C/N 30 a 40 han presentado la disminución de $\text{pH} < 5.0 \pm 0.1$ después de 12 h [29].

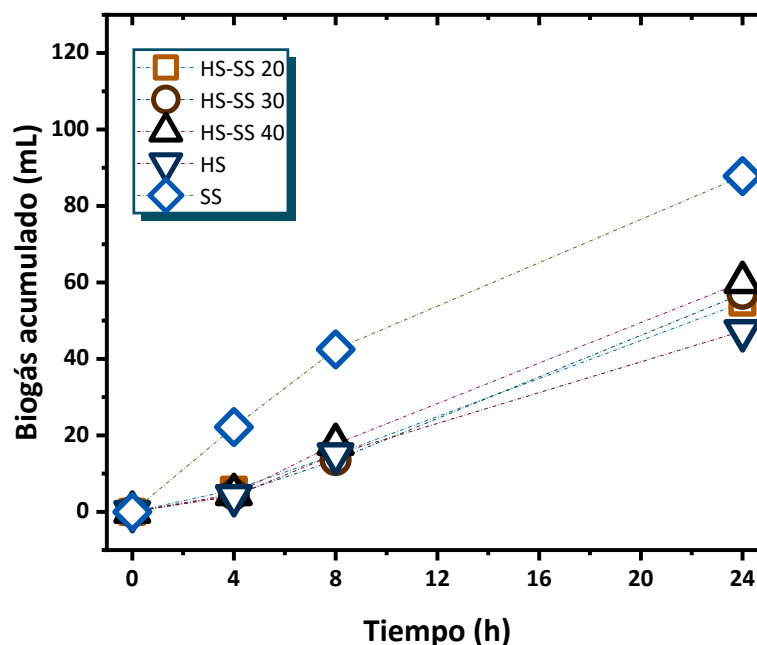


Figura 20. Medición de biogás de la co-digestión (HS-SS) empleando tres relaciones de C/N (20, 30 y 40) y las respectivas mono-digestiones HS (C/N 72) y SS (C/N 86) empleando inóculo granular, $\text{pH} = 6.0 \pm 0.1$, $T = 35^\circ\text{C}$, 50 RPM durante 24 h.

En la **Figura 21** se presenta la medición de la producción de biogás en el sistema tipo lote para la co-digestión HS-HL. De acuerdo con las mediciones se obtuvo una producción de biogás de 122 mL para la relación C/N 30 seguido de 110 mL para la relación C/N 20 y 99 mL para la relación C/N 40. Los volúmenes de biogás producidos con esta serie de experimentos fueron el doble que los obtenidos en las co-digestiones HS-SS además de producir 3 veces más biogás que las mono-digestiones HS o HL (entre 20 – 40 mL). Sin el hecho que la producción de biogás de las co-digestiones HS-HL esté por encima de las mono-digestiones, hace suponer que es más difícil que estas soluciones realicen el efecto de amortiguamiento para direccionar las reacciones bioquímicas.

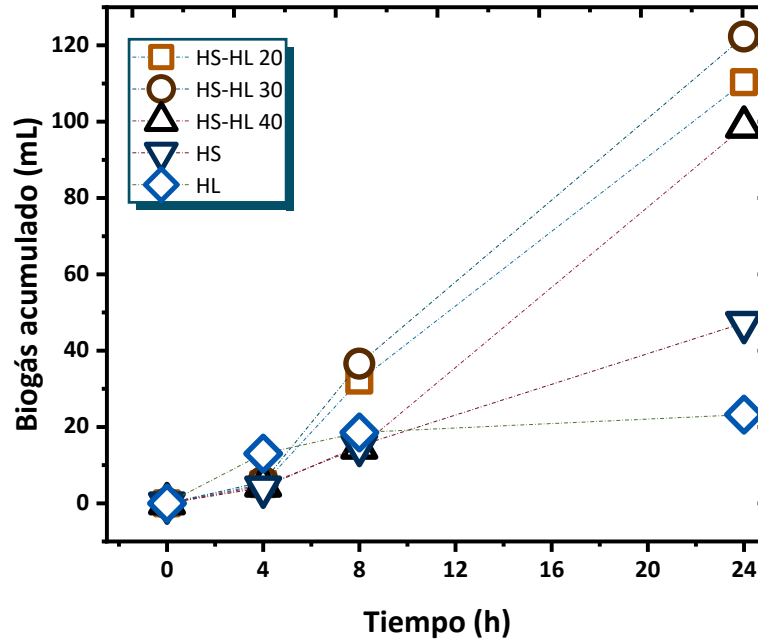


Figura 21. Medición de biogás de la co-digestión (HS-HL) empleando tres relaciones de C/N (20, 30 y 40) y las respectivas mono-digestiones HS (C/N 72) y HL (C/N 1) empleando inóculo granular, pH= 6.0 ± 0.1 , T= 35 °C, 50 RPM durante 24 h.

Demanda Química de Oxígeno, Carbohidratos totales, Sólidos (totales, volátiles y suspendidos volátiles)

Dentro del seguimiento de los reactores preparados (co-digestiones), se realizaron análisis fisicoquímicos a los diferentes tiempos de reacción con la finalidad de medir la evolución de la concentración de carbohidratos, la demanda química de oxígeno además de sólidos totales, sólidos totales volátiles y sólidos suspendidos totales. Siendo, importantes durante el monitoreo de la fermentación oscura.

En la **Tabla 7** se presenta la evolución del consumo de materia orgánica en la co-digestión HS-SS para la relación C/N= 30 y 20, observando alrededor de 30% del consumo de carbohidratos por parte de los microorganismos anaerobios presentes en la co-digestión mientras que para la relación C/N 20 no es muy claro el incremento y se atribuye a la presencia de partículas suspendidas en la co-digestión. Respecto a la degradación de la materia orgánica susceptible de degradar (DQO), se observó un incremento de la DQO después de 24 h, sin embargo, de las caracterizaciones previas se sabe que las co-digestiones evidencian actividad microbiana principalmente para la relación C/N 40, lo que hace suponer que el incremento de la materia se

podría asociar por la presencia del inóculo granular en las co-digestiones. Para el caso de los ST, STV y SST, las tres co-digestiones presentaron el mismo fenómeno.

Para el caso de la co-digestión HS-HL, los resultados de la caracterización fisicoquímica de las co-digestiones con relaciones C/N (20, 30 y 40) (ver **Tabla 7**) presentaron condiciones iniciales de concentración de carbohidratos y de la DQO 50% menores respecto a la co-digestión HS-SS. A pesar de lo anterior, durante las 24 h que duró el proceso de fermentación oscura, las co-digestiones HS-HL lograron consumos de carbohidratos en el intervalo de 60% a 40% y de degradación de la materia orgánica fue de 40 a 15% para las relaciones C/N 20 y 40 respectivamente. Sin embargo, la limitación de carbohidratos podría representar una desventaja para favorecer rutas metabólicas que favorezcan la producción de hidrógeno, debido que estos son los componentes principales para el consumo durante la FO [120].

Tabla 7. Caracterización fisicoquímica de las co-digestiones HS-SS y HS-HL para las relaciones C/N 20, 30 y 40.

Parámetros	C/N 20		C/N 30		C/N 40		
	t= 4 h	t= 24 h	t= 4 h	t= 24 h	t= 4 h	t= 24 h	
HS-SS	CH (mg L ⁻¹)	10616.00 ± 78.89	13114.00 ± 172.87	14452.00 ± 183.64	9636.00 ± 90.44	14214.00 ± 156.15	10504.00 ± 172.97
	DQO (mg L ⁻¹)	20212.50 ± 123.07	26362.00 ± 981.73	28014.50 ± 101.24	35278.50 ± 183.55	17517.00 ± 223.11	6466.50 ± 92.70
	ST (%)	4.12 ± 0.01	4.76 ± 0.03	7.73 ± 0.18	19.48 ± 1.41	5.14 ± 0.24	5.49 ± 0.25
	STV (%)	5.05 ± 0.02	33.18 ± 1.71	8.11 ± 0.62	20.71 ± 1.82	5.20 ± 0.55	6.27 ± 0.47
	SST (%)	29.71 ± 0.90	11.85 ± 0.71	16.25 ± 1.18	27.82 ± 0.79	11.85 ± 1.89	1.51 ± 0.27
HS-HL	CH (mg L ⁻¹)	7003.00 ± 6.00	2568.00 ± 10.50	5593.00 ± 7.10	8272.00 ± 17.95	7847.00 ± 2.00	4521.00 ± 7.09
	DQO (mg L ⁻¹)	18682.50 ± 29.05	11594.00 ± 52.11	11934.50 ± 35.83	10245.50 ± 9.64	10157.50 ± 9.55	15224.00 ± 11.93
	ST (%)	17.47 ± 0.29	32.00 ± 0.48	8.86 ± 0.20	1.29 ± 0.37	11.03 ± 0.42	17.14 ± 0.43
	STV (%)	17.62 ± 0.31	33.23 ± 1.12	9.67 ± 0.38	2.18 ± 0.29	13.15 ± 0.25	20.63 ± 0.27
	SST (%)	15.20 ± 0.40	56.17 ± 0.61	27.44 ± 0.68	2.13 ± 0.24	72.82 ± 0.54	14.56 ± 0.67

Producción de hidrógeno

En la **Figura 22** se presenta la producción de hidrógeno, para la co-digestión HS-SS alcanzó una producción entre 30 – 40 % durante las primeras 8 h, posteriormente descendió hasta 10% así como el descenso del pH en el medio durante la FO, de esta manera se logró observar la baja producción de biogás, remarcando el descenso de producción de biogás junto el descenso de pH como es mencionado en la literatura. Recordando la importancia del pH; ligeras variaciones generan un cambio significativo en las vías metabólicas y por lo tanto varían los rendimientos de hidrógeno durante la FO en TRH cortos, de aquí la importancia de la regulación de pH es esencial para dirigir el proceso anaeróbico y evitar llegar a la metanogénesis [121, 122].

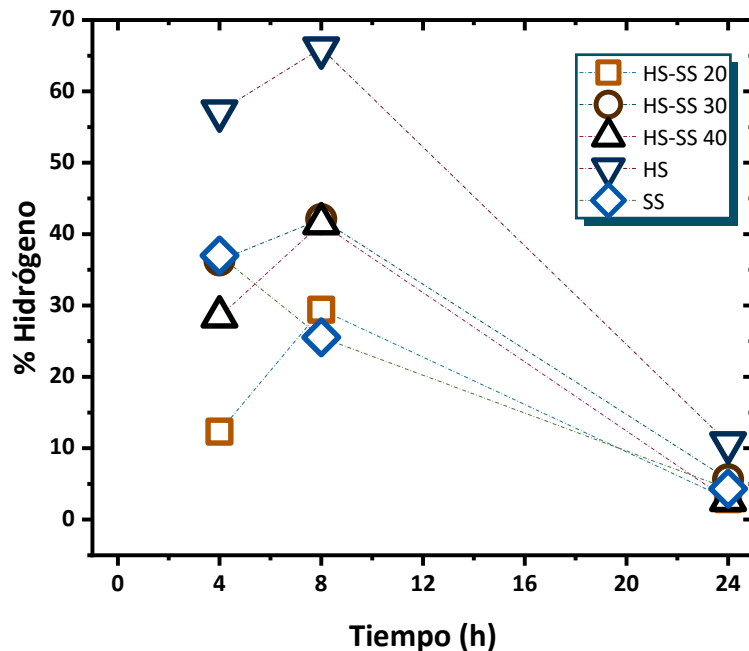


Figura 22. Cuantificación de hidrógeno de la co-digestión (HS-SS) empleando tres relaciones de C/N (20, 30 y 40) y las respectivas mono-digestiones HS (C/N 72) y SS (C/N 86) empleando inóculo granular, pH= 6.0 ± 0.1 , T= 35 °C, 50 RPM durante 24 h.

En la **Figura 23** se presenta la producción de hidrógeno, para la co-digestión HS-HL alcanzó una producción máxima de 40% de hidrógeno dentro de las primeras cuatro horas, pero posteriormente descendió a un 20% a las 8 horas y en adelante se mantuvo en un 10% donde de igual manera el medio se encontraba acidificado. En la co-digestión HS-SS tuvo una producción de hidrógeno de 30 - 40% hasta las 8 h indicando la estabilidad en la comunidad microbiana, no obstante, en esta co-digestión (HS-HL) se logró mantener estable solo 4 h y de ahí el descenso

de la concentración de hidrógeno, mientras que las mono-digestiones mostraron comportamientos muy variables. A pesar de que en la co-digestión HS-HL fue la que presentó mayor producción de biogás (99 – 122 mL) respecto a la co-digestión HS-SS (55 – 60 mL), se obtuvo más hidrógeno en la co-digestión HS-SS, es posible que un mayor volumen de biogás en HS-HL puede indicar una alta acumulación de AGV's, como lo reportó Humberto *et al.* para la co-digestión de lactosuero y estiércol bovino fresco [127].

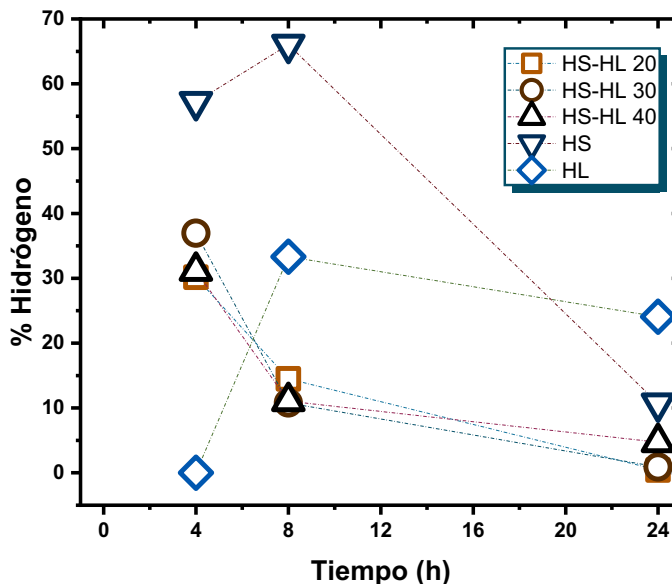


Figura 23. Cuantificación de hidrógeno de la co-digestión (HS-HL) empleando tres relaciones de C/N (20, 30 y 40) y las respectivas mono-digestiones HS (C/N 72) y HL (C/N 1) empleando inóculo granular, pH= 6.0 ± 0.1, T= 35 °C, 50 RPM durante 24 h.

Producción de metabolitos secundarios (AGV's)

En la **Figura 24** se presenta la producción de ácidos grasos volátiles, para la co-digestión HS-SS (con relación C/N 30 y 40) alcanzó una producción de ácido acético que estuvo entre 30 – 40 mM durante las primeras 8 h, posteriormente descendió hasta 10 mM dado por el pH que se vio reflejado HS-SS mientras que la relación C/N 20 la producción de ácido acético se incrementó en el tiempo desde 10 a 70 mM. Para el caso de ácido butírico no se observaron cambios importantes en de la concentración (1 mM) en el tiempo para las 3 relaciones C/N. Como está mencionado en la literatura después de la hidrólisis, en la etapa de la acidogénesis las bacterias convierten la materia orgánica en diferentes productos de fermentación principalmente AGV's como el acetato, el propionato, el formiato, el butirato, el valerato, entre otros. Para las co-

digestiones C/N 40 y 30 la concentración de ácido propiónico y ácido fórmico sus concentraciones estuvieron en el intervalo de 4 a 2 mM y 0.075 a 0.15 mM respectivamente mientras que para la relación C/N 20 las mayores concentraciones de estos analitos se observó a las 4 h (11 y 0.25 mM). Esta diferencia en concentraciones se podría explicar porque para las relaciones C/N ≥ 30 , hay un mayor volumen de HS en la co-digestión HS-SS lo que permite proliferar el crecimiento de microorganismos que favorecen las rutas acidogénicas y acetogénicas. En cambio, con la relación C/N 20 hay un mayor volumen de SS contenido en la co-digestión, lo que probablemente favorece la fermentación propiónica de los hidratos de carbono (lactato) produciendo ácido propiónico, ácido acético y dióxido de carbono [131]. Para el caso de la co-digestión HS-SS, se cuantificó la concentración de ácido valérico, misma que fue entre 5 a 3 mM durante la operación del reactor.

Los resultados de esta investigación durante la FO para la co-digestión se logra observar una mayor producción de ácido acético seguida del ácido propiónico y posterior el ácido valérico, por otro lado, el ácido valérico y fórmico estuvieron presentes en bajas cantidades. El hidrógeno disuelto en la fase líquida puede inhibir la fermentación del tipo etanol y butírica que lo lleva al lactato para finalmente oxidarse a acetato y propionato [127], siendo que en esta FO la evolución de la reacción química como se ha mencionado se favoreció hacia la producción de ácido acético y para el ácido propiónico que en este caso se presenta un similar comportamiento para la relación C/N 30 y 40. En esta co-digestión se favorece la ruta del ácido propiónico en la relación C/N 20 por contener un mayor volumen de suero en la relación y por ello la FO se dirige a la ruta del ácido propiónico.

En la **Figura 25** se presenta la producción de ácidos grasos volátiles, para la co-digestión HS-HL alcanzó una producción entre 30 – 40 mM para el ácido acético en las relaciones C/N 30 y 40 en las primeras 8 h; de nueva cuenta la relación C/N 20 fue la que presentó más variabilidad al alcanzar un máximo de 55 mM a las 8 h pero se consume para las 24 h. Sin embargo, habrá que destacar que en esta co-digestión después del ácido acético se favoreció la ruta butírica principalmente para la co-digestión HS-HL con C/N ≥ 30 al incrementar la concentración de 1 a 4 mM en 24 h, quedando en tercer lugar el ácido propiónico (~ 3.0 mM), seguido por el ácido fórmico con concentraciones menores a 0.10 mM para las diferentes co-digestiones y por último el ácido valérico.

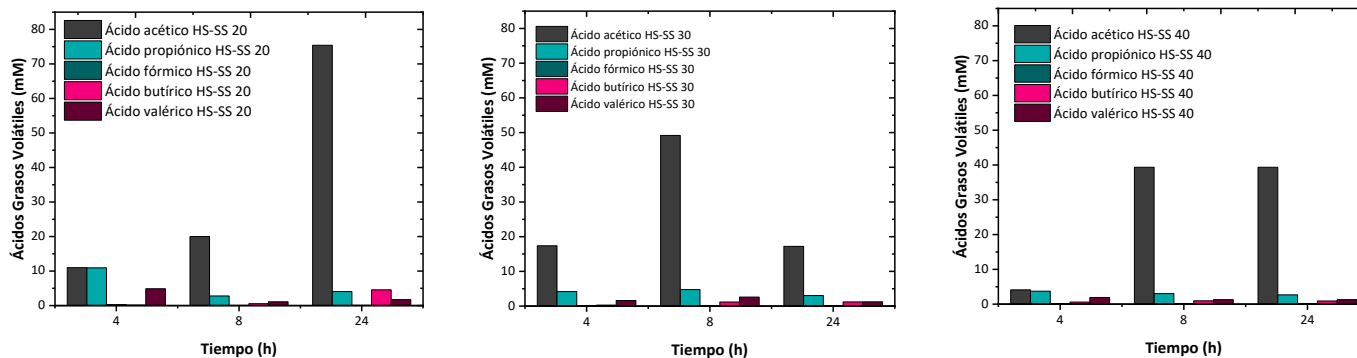


Figura 24. Medición de ácidos grasos volátiles de la co-digestión (HS-SS) empleando tres relaciones de C/N (20, 30 y 40) utilizando inóculo granular, pH= 6.0 ± 0.1, T= 35 °C, 50 RPM durante 24 h.

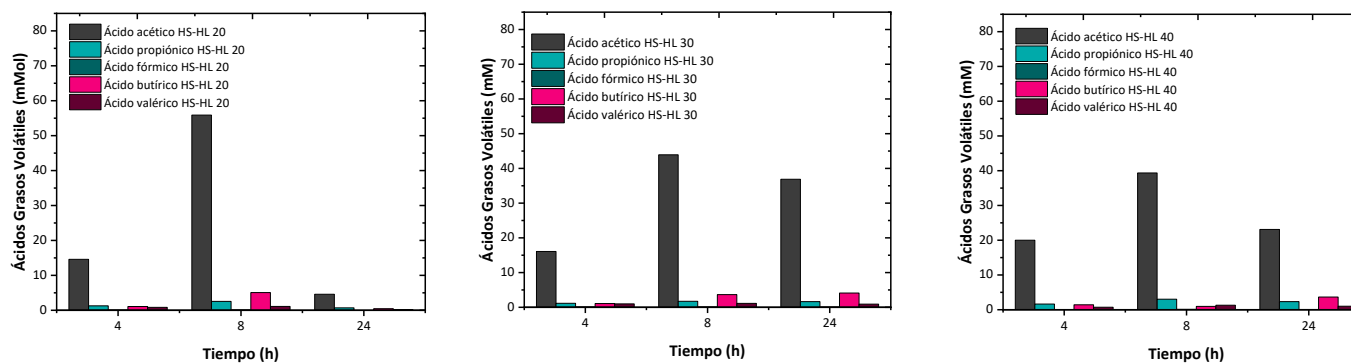


Figura 25. Medición de ácidos grasos volátiles de la co-digestión (HS-HL) empleando tres relaciones de C/N (20, 30 y 40) utilizando inóculo granular, pH= 6.0 ± 0.1, T= 35 °C, 50 RPM durante 24 h.

4.4 Modelo cinético de Gompertz modificado

Co-digestión HS-SS

Con respecto a la cinética del proceso de producción de biogás se evaluó con el modelo de Gompertz modificado, en la **Tabla 8** se muestran los resultados del modelo de Gompertz para la co-digestión HS-SS en las tres relaciones C/N. De acuerdo con los resultados obtenidos, para la co-digestión HS-SS la relación C/N 40 fue la que presentó la mayor producción de biogás con 95 mL y la tasa máxima de producción de biogás (R_m) fue de 3.30 mL H_2 .h⁻¹ y con una fase de latencia (λ) de 3.9 (véase **Figura 26**). Para la relación C/N 30 y la relación C/N 20, los parámetros cinéticos presentan < 1% de diferencia y los valores de R_m y λ son 20% menores que la relación anterior. Esta coincidencia se da, sin embargo, las rutas metabólicas que se favorecieron en cada reactor fueron diferentes. Recordemos que de los análisis de AGV's se observó que las relaciones C/N ≥ 30 favorecieron la ruta acetogénica mientras que la relación C/N 20 se debe a la fermentación propiónica del lactato contenido en SS.

En lo que respecta a los coeficientes de correlación las tres co-digestiones (C/N 40, 30 y 20) presentaron ajustes mayores a 0.90 (véase **Figura 26**).

Tabla 8. Coeficientes de la ecuación de Gompertz modificada para la producción de biogás para la co-digestión HS-SS. Producción máxima, tasa máxima de producción de biogás y el periodo de latencia.

Relación C/N	Biogás máx. (mL)	R_m (mL·B·h ⁻¹)	λ (h)	R ²
20	78.2029	3.2711	3.8813	0.9926
30	77.1617	3.5537	4.5701	0.9951
40	94.8487	3.3049	3.8570	0.9940

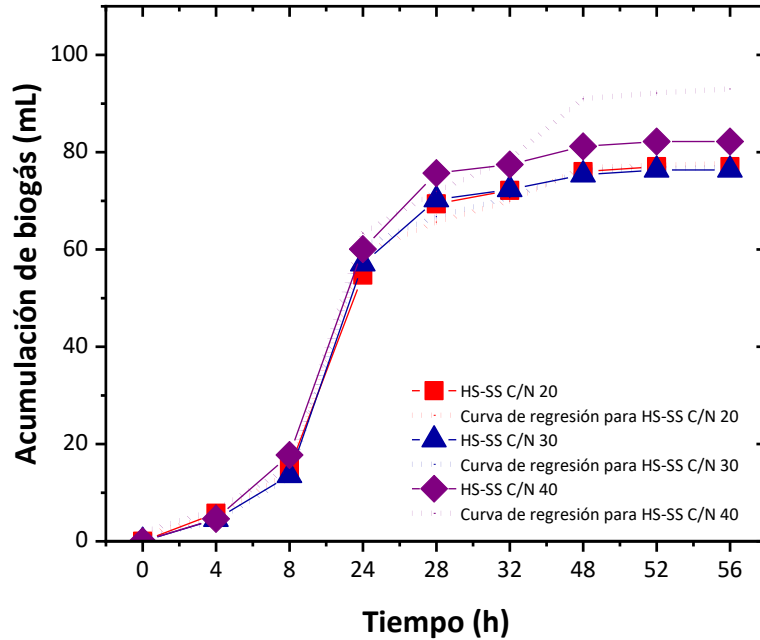


Figura 26. Producción acumulada de biogás para el modelo de Gompertz modificado para la co-digestión HS-SS, relación C/N 20, 30 y 40 en el sistema tipo lote.

Co-digestión HS-HL

En la **Tabla 9** se presentan los resultados del modelo cinético de Gompertz de la co-digestión HS-HL. De acuerdo con los resultados obtenidos, para la co-digestión HS-HL la relación C/N 30 fue la que presentó la mayor producción de biogás con 202 mL y la tasa máxima de producción de biogás (R_m) fue de 10.5 mL B.h^{-1} y con una fase de latencia (λ) de 4.5 (véase **Figura 27**). Para la relación C/N 40 y 20, los valores calculados se encuentran en el mismo intervalo ($\text{Biogás}_{\text{máx}} = 199 \text{ mL}$, $R_m = 199.7 \text{ mL B.h}^{-1}$ y $\lambda = 7.6 \text{ h}$ y $\text{Biogás}_{\text{máx}} = 202.5 \text{ mL}$, $R_m = 9.0 \text{ mL B.h}^{-1}$ y $\lambda = 4.7 \text{ h}$), respectivamente.

El conjunto resultados coincide con las rutas metabólicas descritas en la sección de AGV's donde las tres co-digestiones favorecieron las rutas de acetogénesis y del butirato. En la bibliografía se han reportado valores de la tasa de producción de biogás de la co-digestión HS-HL de $9 \text{ mM BL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ con relación C/N ≈ 35 [131]. Este valor se encuentra en el intervalo de esta investigación, lo que permite comparar los resultados obtenidos.

En lo que respecta a los coeficientes de correlación las tres co-digestiones (C/N 40, 30 y 20) presentaron ajustes mayores a 0.90 (véase **Figura 27**).

Tabla 9. Coeficientes de la ecuación de Gompertz modificada para la producción de biogás en las tres relaciones de C/N para la co-digestión HS-HL. Producción máxima, tasa máxima de producción de biogás y el periodo de latencia.

Relación C/N	Biogás máx. (mL)	R_m (mL·B·h ⁻¹)	λ (h)	R ²
20	202.5032	9.0549	4.7793	0.9971
30	202.6665	10.5175	4.5295	0.9985
40	199.6986	8.3994	7.6181	0.9935

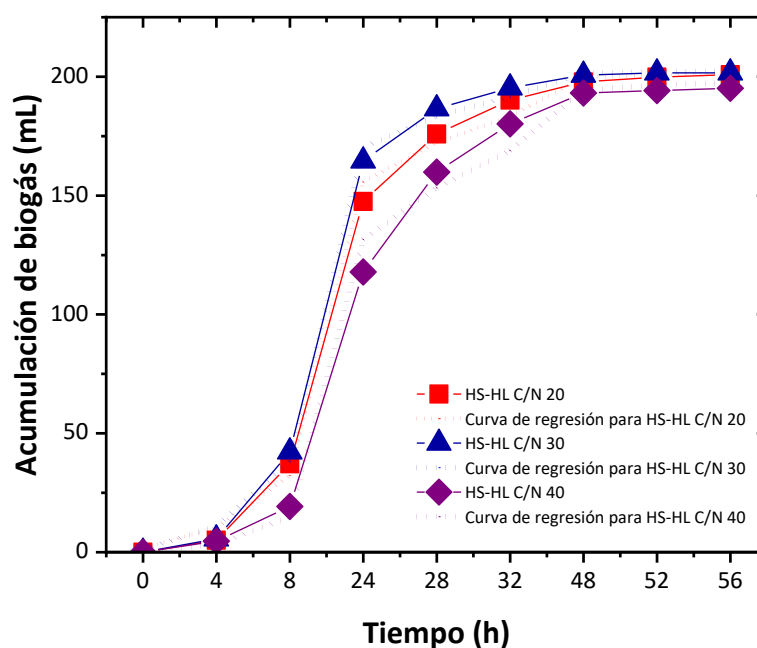


Figura 27. Producción acumulada de biogás para el modelo de Gompertz modificado para la co-digestión HS-HL, relación C/N 20, 30 y 40 en el sistema tipo lote.

4.5 Rendimiento y tasa de producción acumulada de hidrógeno

Co-digestión HS-SS

En la **Figura 28** se presenta el rendimiento y la la tasa de producción acumulada de hidrógeno (VHPR por sus siglas en inglés), para la co-digestión HS-SS (con relación C/N 30 y 40), alcanzando un rendimiento máximo de $0.0011 \text{ mL H}_2 \text{ gSTV}^{-1}_{\text{rem}}$, $0.0012 \text{ mL H}_2 \text{ gSTV}^{-1}_{\text{rem}}$ y $0.0017 \text{ mL H}_2 \text{ gSTV}^{-1}_{\text{rem}}$ para las relaciones C/N 20, 30 y 40 respectivamente y para la tasa de producción con valores de $0.0030 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $0.0023 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $0.0031 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para las relaciones C/N 20, 30 y 40 respectivamente.

Siendo rendimientos bajos debido a la complejidad de la co-digestión y por el inóculo (lodo granular), que en comparación con otros rendimientos en sistema batch se obtuvo $41.23 \text{ mL H}_2 \text{ gCOD}^{-1}_{\text{removido}}$ utilizando glucosa como sustrato, siendo este de alta pureza por lo que se ve reflejado este alto rendimiento en comparación con lo que se presenta en este trabajo, además de que adicionaron como inóculo un consorcio provisto de *Enterobacter cloaca*, *Citrobacter freundii* y *Bacillus coagulans*, productores de hidrógeno, también utilizando manosa monohidratada con *Bacillus anthracis* con un rendimiento máximo de $236 \text{ mL H}_2 \text{ gCOD}^{-1}$ [65, 132].

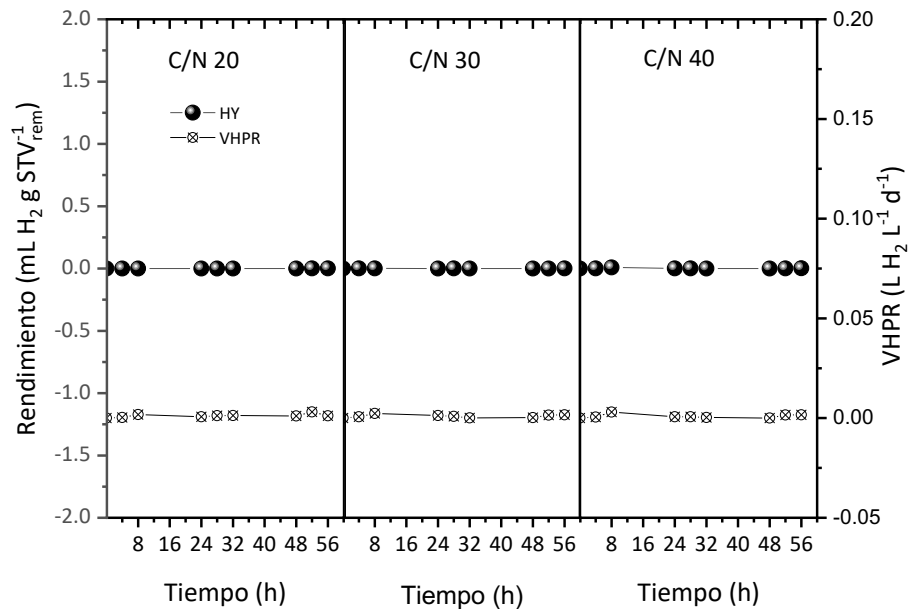


Figura 28. Rendimiento y productividad de hidrógeno para la co-digestión HS-SS, relación C/N 20, 30 y 40 en el sistema tipo lote.

Co-digestión HS-HL

En la **Figura 29** se presenta el rendimiento y la la tasa de producción acumulada de hidrógeno (VHPR por sus siglas en inglés), para la co-digestión HS-HL (con relación C/N 20, 30 y 40), alcanzando un rendimiento máximo de $0.0007 \text{ mL H}_2 \text{ g STV}^{-1}_{\text{rem}}$, $0.0006 \text{ mL H}_2 \text{ g STV}^{-1}_{\text{rem}}$ y $0.0036 \text{ mL H}_2 \text{ g STV}^{-1}_{\text{rem}}$ para las relaciones C/N 20, 30 y 40 respectivamente y para la tasa de producción con valores de $0.0008 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $0.0007 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $0.0012 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para las relaciones C/N 20, 30 y 40 respectivamente. Presentando la misma tendencia de un bajo rendimiento para la relación C/N 20 y 30, para la relación C/N 40 fue doble en comparación con la co-digestión HS-SS:

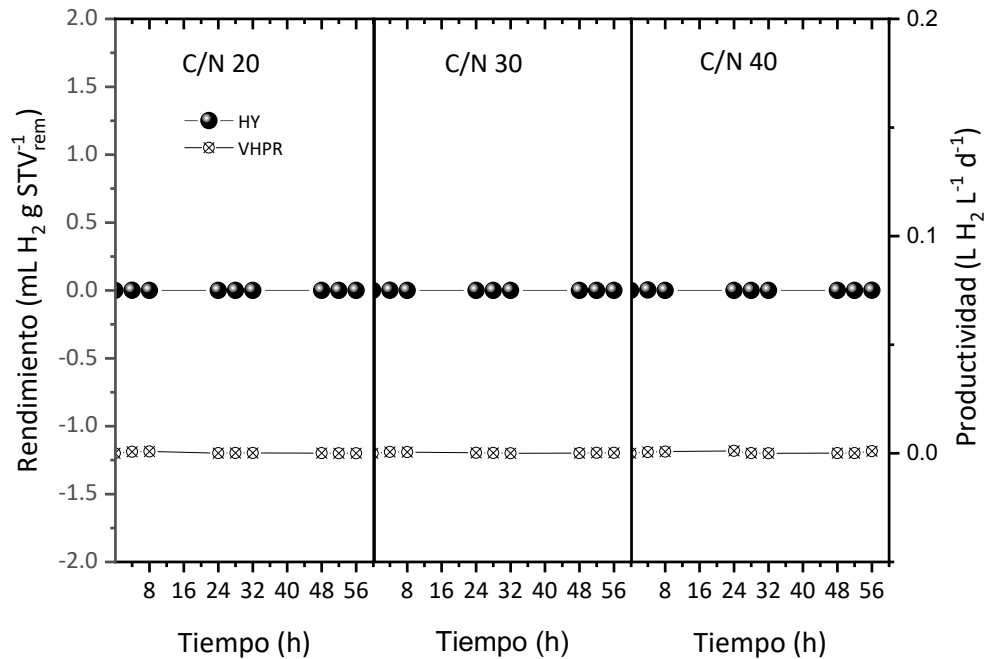


Figura 29. Rendimiento y productividad de hidrógeno para la co-digestión HS-HL, relación C/N 20, 30 y 40 en el sistema tipo lote.

4.6 Análisis estadístico

Los Análisis de Varianza (ANOVA) de las co-digestiones HS-SS y HS-HL se desarrollaron en Excel Microsoft 2016, para las tres relaciones C/N 20, 30 y 40. La hipótesis nula de la que parte el ANOVA es que no existe diferencia significativa en la producción de biogás para cada relación C/N. A partir de los resultados experimentales de la co-digestión HS-SS, la suma de relaciones C/N 20, 30 y 40 fue 90 y su correspondiente producción de biogás (77, 76 y 82 mL) fue 235 como se presenta en la **Tabla 10**. Por lo tanto, al realizar el ANOVA el valor de probabilidad fue de 0.0013, y es un valor menor que el nivel de confianza establecido (0.0500), por lo tanto, la hipótesis nula se rechazó por lo que existe diferencia significativa en la producción de biogás para cada relación C/N.

Tabla 10. Datos empleados para el ANOVA de las co-digestiones HS-SS.

Grupos	Número de datos	Suma	Promedios	Varianza
Relación C/N	3	90	30	100
Biogás acumulado (mL)	3	235	78.3333	10.3333

Tabla 11. Análisis de Varianza para la evaluación de las tres relaciones C/N (20, 30 y 40) en la co-digestión HS-SS.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3504.1667	1	3504.1667	63.5196	0.00134	7.7086
Dentro de los grupos	220.6667	4	55.1667			
Total		5				

Para el caso de la co-digestión HS-HL, el procedimiento empleado para los grupos (relación C/N y biogás acumulado) y datos fue el mismo que el caso anterior. Al realizar el ANOVA, el valor de probabilidad fue de 1.05E-05, y es un valor menor que el nivel de confianza establecido (0.0500), por lo tanto la hipótesis nula igualmente se rechazó, por lo que existe diferencia significativa en la producción de biogás para cada relación C/N.

4.7 Escalado de la co-digestión anaerobia

En base a la información obtenida en los sistemas tipo lote se procedió a llevar a cabo el escalado a reactor anaerobio empleando dos configuraciones, el reactor anaerobio de flujo ascendente (RAFA) y el reactor anaerobio híbrido de flujo ascendente (RAHFA), utilizando la co-digestión HS-SS con la relación C/N 30 y pH constante (6.0 ± 0.1) a diferentes TRH. Se tomó esta relación a pesar que la relación C/N 40 presentó mejor desempeño, pero la presencia de una mayor cantidad de sólidos ocasionó un mayor taponamiento en la línea de alimentación de los reactores.

En esta sección, también se realizó la caracterización de los sustratos previo a la co-digestión como: carbohidratos, DQO, pH y nitrógeno total para poder determinar la relación C/N de interés. Durante la operación del RAHFA a las condiciones en el proceso, el pH fue constante (pH de 6.0 ± 0.1) debido a la rápida acidificación por parte de los sustratos. La caracterización fisicoquímica, la medición de producción de biogás, la cuantificación de gases (H_2 , CO_2 , CO y CH_4) y ácidos grasos (ácido acético, ácido butírico, ácido propiónico, etc.) fueron determinados al final del ciclo que este corresponde al TRH de 3, 8 o 12 h.

4.7.1 Resumen de reactores híbridos de flujo ascendente sin platos y con platos

En la **Tabla 12** se presenta un resumen comparativo de los principales resultados de la caracterización de los parámetros fisicoquímicos de los reactores RAFA y RAHFA, operados a iso-condiciones (TRH de 8 h, pH = 6.0 ± 0.1 y C/N 30).

Los resultados obtenidos indican que el reactor RAFA trabajó por 4 ciclos y los principales parámetros fisicoquímicos indican que el porcentaje de remoción de Carbohidratos fue de 76 %, el porcentaje de remoción de la DQO de 50 %, los sólidos totales $60\% \pm 4$, sólidos totales volátiles de 63 ± 4 % y la producción de biogás de 840 mL con un máximo porcentaje de hidrógeno en biogás de 43 % (3^{er} ciclo), sin embargo al 4^{to} ciclo este porcentaje disminuyó hasta 37 % como consecuencia de la acidificación del reactor a pesar que durante toda la operación del reactor se realizaron ajustes con NaOH.

Por las características del reactor no fue posible mantener una agitación continua donde el sustrato se precipitó conllevando a la desactivación del reactor. Por, lo tanto se procedió a trabajar en el RAHFA, que demostró desempeños muy similares (Carbohidratos 69 ± 8 %, DQO de 56 ± 7 %, los sólidos totales 55 ± 10 %, sólidos totales volátiles 60 ± 11 % y la producción de

biogás de 5677 mL (30 ciclos) con un máximo porcentaje promedio de hidrógeno en biogás de 40 %. A través de esta configuración fue posible trabajar la co-digestión de manera continua hasta 50 ciclos. Este fenómeno de desactivación del reactor RAFA ya se ha reportado en otras co-digestiones de cáscaras de frutas con lodos de planta de tratamiento [20] sin embargo, no se ha profundizado debido a que el interés del trabajo es hacia la producción de hidrógeno mismo que se aborda en la siguiente sección a través del reactor RAHFA.

Tabla 12. Resultados de parámetros fisicoquímicos para la operación de reactores RAFA y RAHFA operados a iso-condiciones de temperatura (25-35 °C, $pH_{inicial} 6.0 \pm 0.1$).

Tipo de reactor	TRH (h)	Remoción (%)				Hidrógeno en biogás (%)				
		CH	DQO	ST	STV	Biogás (mL)	Ciclo 1	Ciclo 4	Ciclo 10	Ciclo 30
RAFA	8	76 ± 8	51 ± 4	60 ± 4	63 ± 4	840	22	37	-	-
RAHFA	8	69 ± 8	56 ± 7	55 ± 10	60 ± 11	7879	20	44	61	20

4.7.2 Reactor anaerobio híbrido de flujo ascendente operando a TRH 3, 8 y 12 h

Medición de potencial de hidrógeno (pH)

En la **Figura 30** se presenta los resultados de la evolución del pH en la co-digestión HS-SS en el RAHFA operado a pH constante a tres TRH (3, 8 y 12 h) durante 30 ciclos. Para el TRH 3, se observó que el pH de la salida del reactor cae rápidamente hasta valores menores de 4.50 ± 0.86 en los primeros ciclos a pesar del ajuste de pH. Esta fluctuación del pH se mantiene en el intervalo de 5 a 3.7 a largo de los 30 ciclos. Reflejándose estos valores por la falta de capacidad de la disolución amortiguadora en el medio. Para el TRH 8 h el perfil del pH fue similar al anterior (3.99 ± 0.15) sin embargo, está claro que la acidificación del reactor en los primeros 12 ciclos de operación fue amortiguada por las propiedades *buffer* de la co-digestión lo que posiblemente puede favorecer rutas metabólicas favorables a la producción de hidrógeno [133]. Para el caso del TRH 12 h, la operación del reactor fue más estable durante los 30 ciclos a pesar del pH al término de cada ciclo fue cercano a 4.10 ± 0.09 . Además, tampoco se observó la caída del pH en los primeros ciclos debido a que se trabajó de manera continua con el TRH de 3 h.

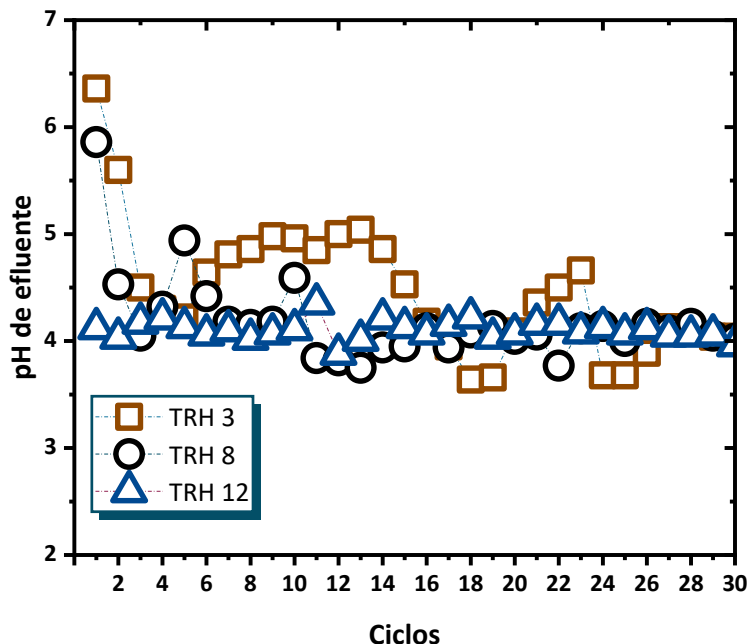


Figura 30. Monitoreo de pH del efluente de los reactores bajo operación en TRH 3, 8 y 12 h.

En este punto es importante destacar que ligeras variaciones de pH pueden provocar un cambio significativo en las vías metabólicas y en consecuencia en las concentraciones de hidrógeno y de los metabolitos secundarios, especialmente para TRH cortos, donde es de suma importancia la regulación de pH para que se genere el proceso anaerobio y prevenir o inhibir la metanogénesis con un pH entre 5.5 - 6 [134]. Existen reportes que explican que debido a que el ácido acético es el principal producto de la fermentación, es muy posible que se presente una acumulación respecto al tiempo ocasionando la reducción del pH del medio, afectando directamente al pH intracelular de la célula microbiana causando una alteración metabólica por acumulación de aniones. Sin embargo, cuando el pH se encuentra por debajo de su valor del pKa (4.75), el ácido acético se protona y estas moléculas penetran fácilmente en las células bacterianas mediante difusión pasiva y de disociación en el citosol debido a la acumulación de aniones en las células y al aumento del pH intracelular [135].

En este trabajo a pesar de la dificultad de mantener un pH cercano a 6.00, la naturaleza de SS influyó en la FO. De acuerdo con Montecchio *et al.* el alto contenido de lactosa en el suero de queso (70 % peso) se hidroliza en el ambiente anaerobio rápidamente a glucosa y galactosa [129] y favorecer el crecimiento de microorganismos productores de hidrógeno.

Producción de biogás

En la **Figura 31** se presenta los resultados de producción de biogás en la co-digestión HS-SS en el RAHFA operado a pH constante a tres diferentes TRH (3, 8 y 12 h) durante 30 ciclos para comparar el desempeño del reactor. De acuerdo con la gráfica se puede observar que la producción de biogás fue de 2192 mL < 2710 < 5670 mL para 3, 12 y 8 h respectivamente, observándose que al final de 30 ciclos la producción de biogás fue tres veces mayor (5670 mL) para TRH 8 h respecto a TRH 3 h. A partir de lo anterior, se debe destacar que la alta producción de biogás para el TRH 8 h está directamente asociado con la capacidad *buffer* de la co-digestión durante la operación del reactor como se mostró en la sección anterior. Probablemente el intervalo de operación del pH en el reactor, sugiere que las rutas metabólicas predominantes fueron procesos de acidogénesis al utilizar co-digestiones con relaciones C/N en el intervalo de 20 a 40, y que se asocian con la capacidad de degradación de carbohidratos [125]

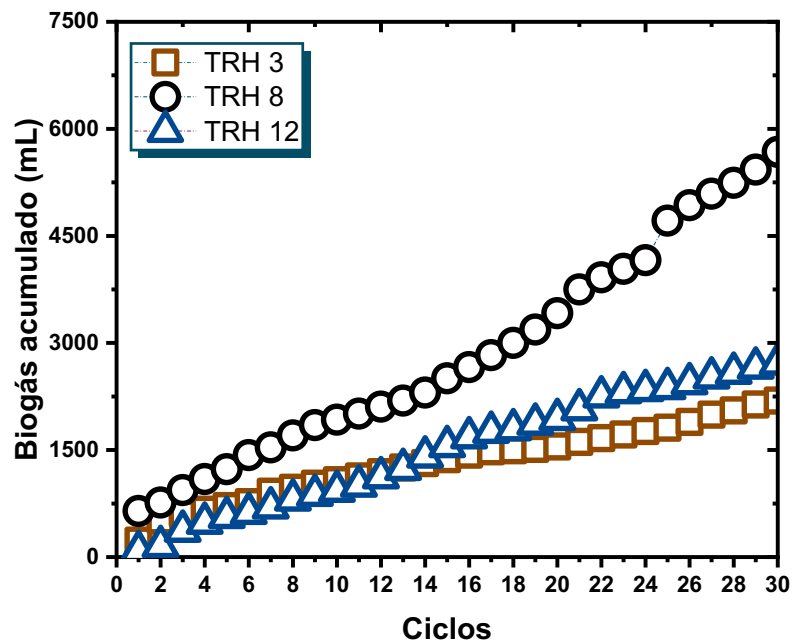


Figura 31. Monitoreo del biogás acumulado de los reactores bajo operación en TRH 3, 8 y 12 h.

Producción de hidrógeno

En la **Figura 32** se presentan los resultados de la producción de hidrógeno en el RAHFA operado a pH constante a tres diferentes TRH (3, 8 y 12 h) durante 30 ciclos. Para el TRH 3 h, se observó que la co-digestión HS-SS inició con 60 % de hidrógeno en biogás, pero durante los 30 ciclos de operación la producción de biogás es muy frecuente promedio 45 ± 11 % de hidrógeno en biogás durante los 30 ciclos, el porcentaje restante fue cuantificado como CO_2 . Al comparar la evolución del porcentaje de hidrógeno con respecto a la evolución pH, no se observó que ambos perfiles presentaran una fuerte relación porque la producción de hidrógeno varió con mayor frecuencia probablemente como resultado de la inestabilidad en las rutas metabólicas debido al TRH corto. Sin embargo, la producción de hidrógeno en el biogás se presentó dentro del intervalo de pH reportado por varios autores [135].

Para el caso del RAHFA que trabajó con TRH de 8 h, el desarrollo de las rutas metabólicas fue diferente, aquí se observa como las bacterias se van aclimatando a lo largo de los primeros 8 ciclos para luego alcanzar y mantener la producción de hidrógeno cerca al equilibrio termodinámico (49 ± 15 %). Después del ciclo 18 el porcentaje de hidrógeno disminuye hasta 20% pero vuelve a incrementar y se mantiene en 50 % hasta el final de la operación. Como ya se mencionó previamente, la característica de amortiguación de la co-digestión y el balance de nutrientes de la co-digestión coadyuvan a que las rutas metabólicas sean más estables y favorezcan la producción de hidrógeno.

Finalmente, para el RAHFA con TRH 12 h, tampoco se observó una relación entre el pH y el porcentaje de hidrógeno, debido a que en este experimento se observó que en los primeros ciclos de operación la aclimatación de las bacterias presentes en la co-digestión alcanzó un 36 ± 14 % de hidrógeno en el biogás. Sin embargo, a partir del ciclo 5 presenta inestabilidad y bajo porcentaje de producción de hidrógeno. Finalmente, después del ciclo 14 la producción de hidrógeno se estabilizó sin embargo no sobrepasó el 50 %.

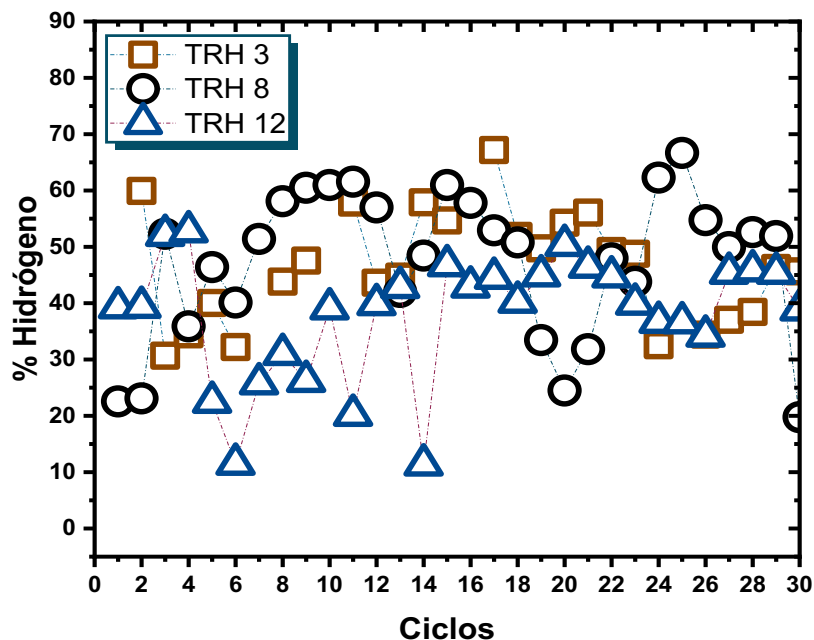


Figura 32. Porcentaje de hidrógeno en biogás en el RAHFA operado a diferentes TRH 3, 8 y 12 h.

Remoción de carbohidratos

En la **Figura 33A** se presenta los resultados para la remoción de carbohidratos en la co-digestión HS-SS en el RAHFA operado a pH constante y tres diferentes TRH (3, 8 y 12 h) durante 30 ciclos. Durante la operación del reactor al TRH 3 h, se observó que el porcentaje de remoción de carbohidratos osciló en el intervalo de 60 a 40 % desde el ciclo 1 hasta el ciclo 23, probablemente como consecuencia del corto periodo de aclimatación de los microorganismos con actividad hidrolítica o fermentativa, sin embargo cuando el reactor se acidificó (ciclo 24) el porcentaje de remoción incrementó hasta un 80 % pero enseguida disminuyó para finalizar la reacción probablemente por la presencia de microorganismos metanogénicos.

Para el caso del reactor operado con TRH 8 h, la remoción de carbohidratos fluctuó en el intervalo de 85 a 60 ± 9 % en los primeros 14 ciclos, después para los siguientes ciclos de operación el intervalo de remoción fue mayor (70 a 40 %) como consecuencia del ajuste de pH y la sinergia de los procesos metabólicos en la co-digestión HS-SS; a través de dos grupos de microorganismos fermentadores que catabolizan los monosacáridos y aminoácidos para producir ácidos grasos. Del sistema en tipo lote, se identificó que la acetogénesis también tuvo

lugar a estas condiciones a través del metabolismo del ácido butírico y ácido propiónico generados en etapas previas.

Finalmente, para el caso del reactor operado con TRH 12 h, la remoción de carbohidratos descendió en el intervalo de 80 a 50 % durante los 30 ciclos de operación. Pero la frecuencia de esta fluctuación a lo largo de los ciclos de operación fue lenta respecto a los otros TRH. Esperando que la producción de hidrógeno sea favorecida debido a que el proceso acidogénico es termodinámicamente más favorable respecto a la reacción acetogénica.

A partir de lo anterior es evidente que la producción de hidrógeno es sensible al porcentaje de remoción para los diferentes TRH. Es decir, los microorganismos productores de hidrógeno degradan carbohidratos solubles mientras el reactor mantiene las condiciones más favorables, sin embargo, cuando se presentan cambios, inmediatamente se favorecen otras rutas metabólicas donde se produce CO_2 , y en consecuencia se incrementó el porcentaje de remoción además de la acidificación del reactor. Al comparar estos resultados con otras co-digestiones, Cruz Méndez (2021) reportó para la co-digestión de agua residual de la industria cervecera con suero de queso, presentó la misma tendencia para TRH entre 9 a 12 h con remociones de carbohidratos que estuvo en el intervalo de 70 a 90 %, atribuido al agua residual de cerveza [29].

En la **Figura 33B** adjunta se presentan los resultados de la relación C/N a la salida del reactor en los diferentes TRH (3, 8 y 12 h), como se podrá observar en todos los casos se observó una disminución de la relación a C/N 30 como resultados de la actividad microbiana.

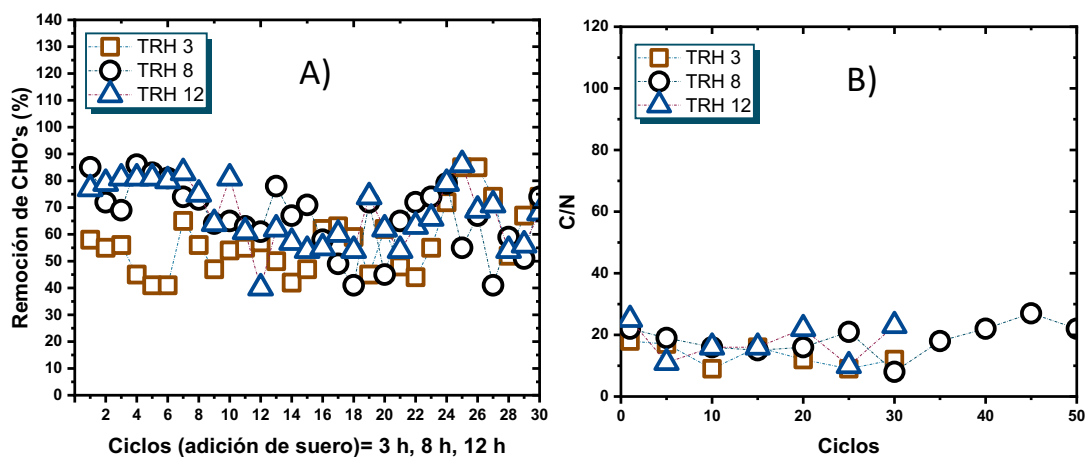


Figura 33. Porcentaje de remoción de los carbohidratos y la relación C/N 30 a la salida del RAHFA trabajando a diferentes TRH 3, 8 y 12 h.

Remoción de DQO

En la **Figura 34** se presentan los resultados de la remoción de DQO en la co-digestión HS-SS en el RAHFA operado a pH constante y en tres diferentes TRH (3, 8 y 12 h) durante 30 ciclos. Cuando la co-digestión se realizó a TRH 3 h durante 30 ciclos, el porcentaje de remoción de DQO fue entre 70 a 40 %, y es el resultado de las rutas metabólicas que tienen lugar en el intervalo de pH 4.47 ± 0.61 . Para el caso del TRH 8 h, la remoción de DQO, varió entre 70 a 50 % durante los 30 ciclos de operación del reactor sin embargo hay una ligera disminución del porcentaje de DQO en los últimos ciclos asociados con los gradientes de pH en el reactor. Finalmente, para el TRH 12 h las variaciones en los porcentajes de remoción no es diferente a los otros reactores en los primeros 12 ciclos, pero posteriormente se observaron variaciones en el porcentaje de remoción de la DQO entre 50 a 15 % de manera frecuente en los siguientes ciclos. Este resultado coincide con un incremento en la producción de biogás y el porcentaje de degradación de carbohidratos, evidenciando la aclimatación de la actividad bacteriana en el reactor debido a mayor contacto con el sustrato y pH estable (≥ 4).

A partir de la descripción anterior, está claro que la producción de hidrógeno está directamente asociada con la degradación de la materia orgánica susceptible de degradar porque los TRH de 3 y 12 h, presentaron mayor porcentaje de remoción sin embargo los resultados de biogás no fueron selectivos a esta molécula.

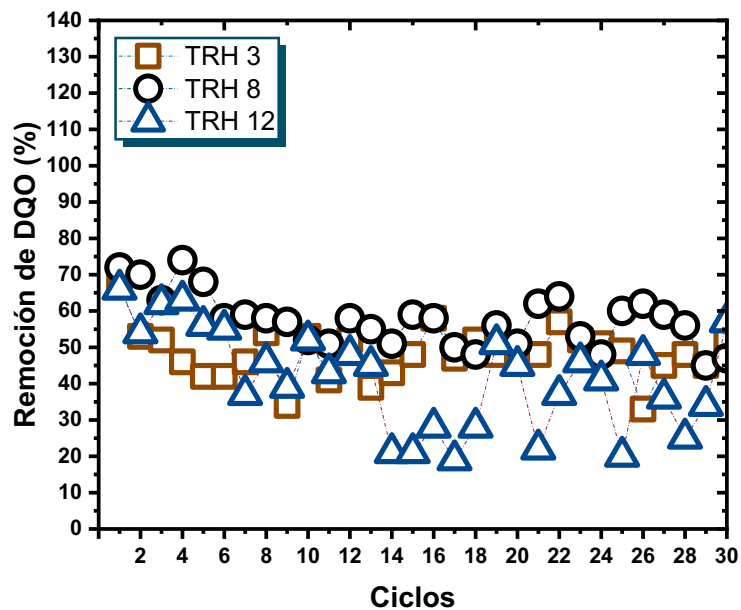


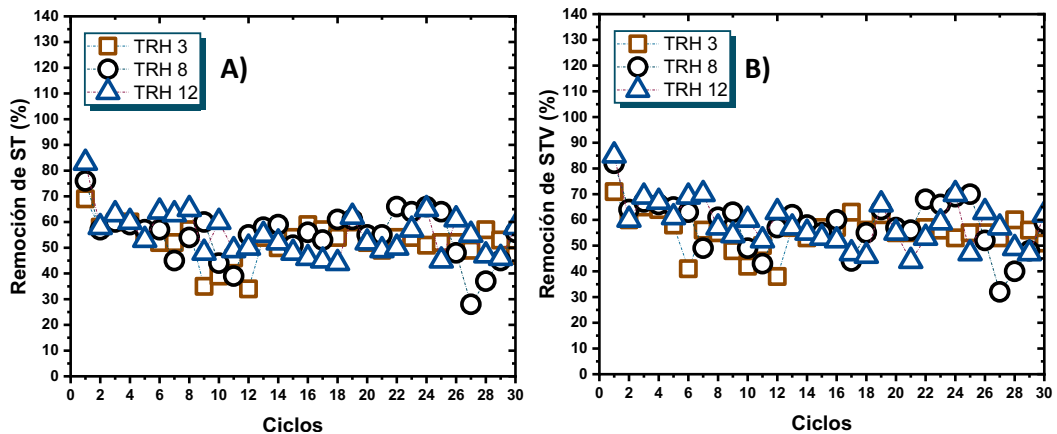
Figura 34. Remoción de la DQO (%) de los reactores bajo operación en TRH 3, 8 y 12 h.

Remoción de ST, STV y SST

En la **Figura 35A** se presentan los resultados del porcentaje de remoción de sólidos totales para la co-digestión HS-SS en el RAHFA operado a pH constante y a tres diferentes TRH (3, 8 y 12 h) durante 30 ciclos. Para los diferentes TRH, el porcentaje de remoción inicia en $70 \pm 5 \%$ y conforme pasan los ciclos se observaron variaciones en el intervalo de 65 a 40 %. Ciertamente, los sólidos totales representan el total de la materia residual y quizás por esa razón no se observaron los cambios asociados a los ajustes de pH o a la actividad microbiana.

Para el caso de los sólidos totales volátiles (STV, véase **Figura 35B**), se observó la misma tendencia que en los ST además de los mismos intervalos de remoción (65 a 40 %), pero en este caso el porcentaje de remoción se asoció con la eliminación de la materia orgánica.

Finalmente, en la **Figura 35C**, se presentan los resultados de remoción de SST para la co-digestión HS-SS en el RAHFA. Para el TRH 3 y 8 h el intervalo de remoción fluctuó entre 90 a 70 % y que coincide con reportes en la literatura, donde se menciona que 75 % de los sólidos suspendidos en el agua son de origen orgánico [129]. Para TRH 12 h, en las corridas (ciclo) 6, 7, 8, 9, 15, 28 y 29 se observaron variaciones más importantes en el porcentaje de remoción sin embargo no se observó que infiriera en las variables de peso del proceso.



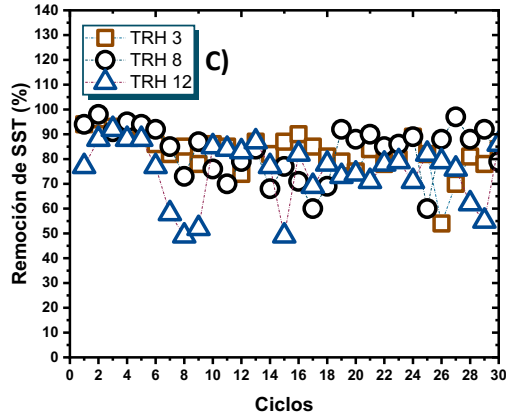


Figura 35. Operación en TRH 3, 8 y 12 h. (A) Sólidos Totales, (B) Sólidos Volátiles Totales y (C) Sólidos Suspendidos Totales.

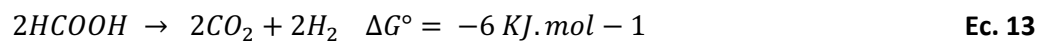
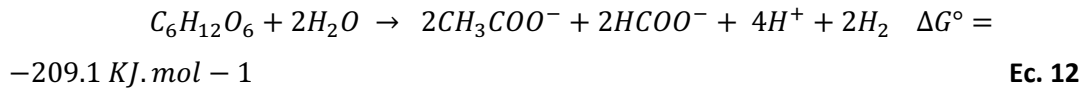
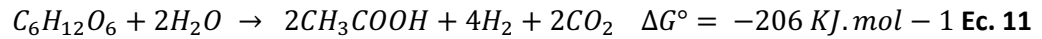
Metabolitos secundarios en la FO

Una de las vías de producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura de la glucosa al utilizar cultivos mixtos, vía común para anaerobios facultativos es a través de la ruta de la glucólisis teniendo como subproductos AGV's. A continuación, se presentan los resultados de los principales subproductos identificados (ácido acético, ácido propiónico, ácido fórmico, ácido butírico y ácido valérico) por cromatografía de gases para las tres series de TRH (3, 8 y 12 h) utilizando la co-digestión HS-SS con una operación de 30 ciclos.

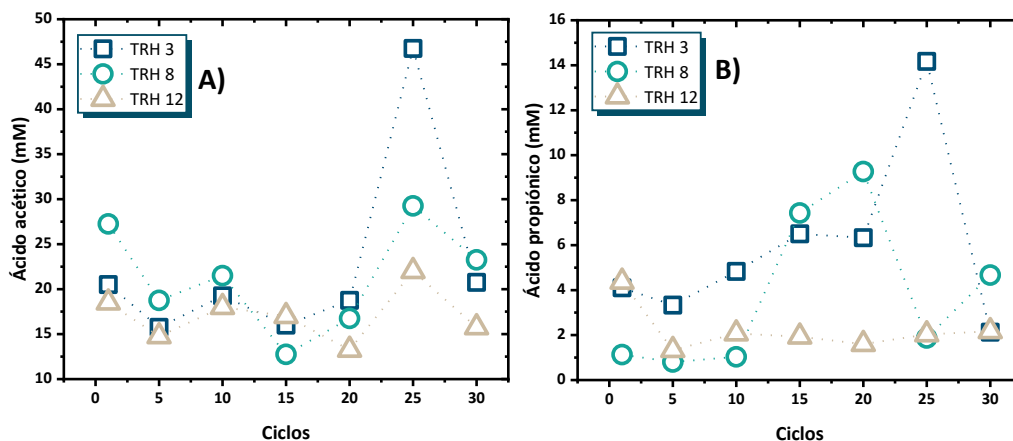
En la **Figura 36** se presentan las gráficas de la cuantificación de los AGV's y se observaron dos principales rutas a lo largo de las 30 corridas: la primera fue ácido acético ($25 - 15 \text{ mM L}^{-1}$) > ácido fórmico ($15 - 10 \text{ mM L}^{-1}$) > ácido butírico ($10 - 3 \text{ mM L}^{-1}$) > ácido valérico ($\sim 5 \text{ mM L}^{-1}$) > ácido propiónico ($\sim 2 \text{ mM L}^{-1}$) y fue característica de los TRH 3 y 8 h mientras que para TRH 12 h, fue evidente la producción de hidrógeno a dos etapas mediante la fermentación del acetato y formiato de acuerdo con los siguientes resultados: ácido fórmico ($40-20 \text{ mM L}^{-1}$) > ácido acético ($20 - 15 \text{ mM L}^{-1}$) > ácido valérico ($10 - 15 \text{ mM L}^{-1}$) > ácido propiónico ($8 \text{ a } 4 \text{ mM L}^{-1}$) > ácido butírico ($< 1 \text{ mM L}^{-1}$).

De acuerdo con lo anterior la producción de ácido acético (véase **Ecuación 11**) y ácido butírico fueron las rutas predominantes en la co-digestión por los TRH 3 y 8 h coincide con lo reportado en la literatura, donde se señala a estos metabolitos como los principales subproductos de la producción de hidrógeno en el intervalo de pH 5.5 a 4.6 [137]. Por otra parte, el ácido fórmico y el ácido acético se cuantificó en el intervalo de concentraciones entre 40 a 20

mM L⁻¹, para la co-digestión con el TRH 12 h y que coincide con la evolución de la estructura microbiana reportado en las **Ecuaciones 12** y **13**. Por otro lado, las bacterias ácido lácticas también influyen fuertemente en la acidificación del medio como consecuencia de la producción de ácido láctico [138].



A partir del análisis bibliográfico, Cruz Méndez *et al.* reportan la actividad microbiana de la co-digestión agua de cervecera con suero de queso en un reactor batch (C/N=35, T=35°C, y sin control de pH) [29], pero empleando el mismo inóculo granular que el reportado en este trabajo. Para TRH 8 h, la ruta acetogénica fue la dominante y las especies predominantes fueron *Lactococcus lactis* (40 %), *Leuconostoc mensenteroides* (20 %), *Lactobacillus delbrueckii* (8 %) y *Lactobacillus casei* (5 %), mientras que a 24 h la abundancia del género *Lactococcus lactis* disminuyó hasta 20 % y *Leuconostoc mensenteroides* casi desaparece, en cambio *Lactobacillus casei* incrementó hasta 20 % además de proliferar el crecimiento del filo *Firmicutes* con el género *Bacillus* (18 %). Esta evolución microbiana está íntimamente relacionada con la producción de ácidos grasos asociado con el TRH, en particular sobre el crecimiento de las bacterias ácido lácticas quienes influyen fuertemente en la acidificación de la co-digestión resultado de la producción de ácido láctico [29].



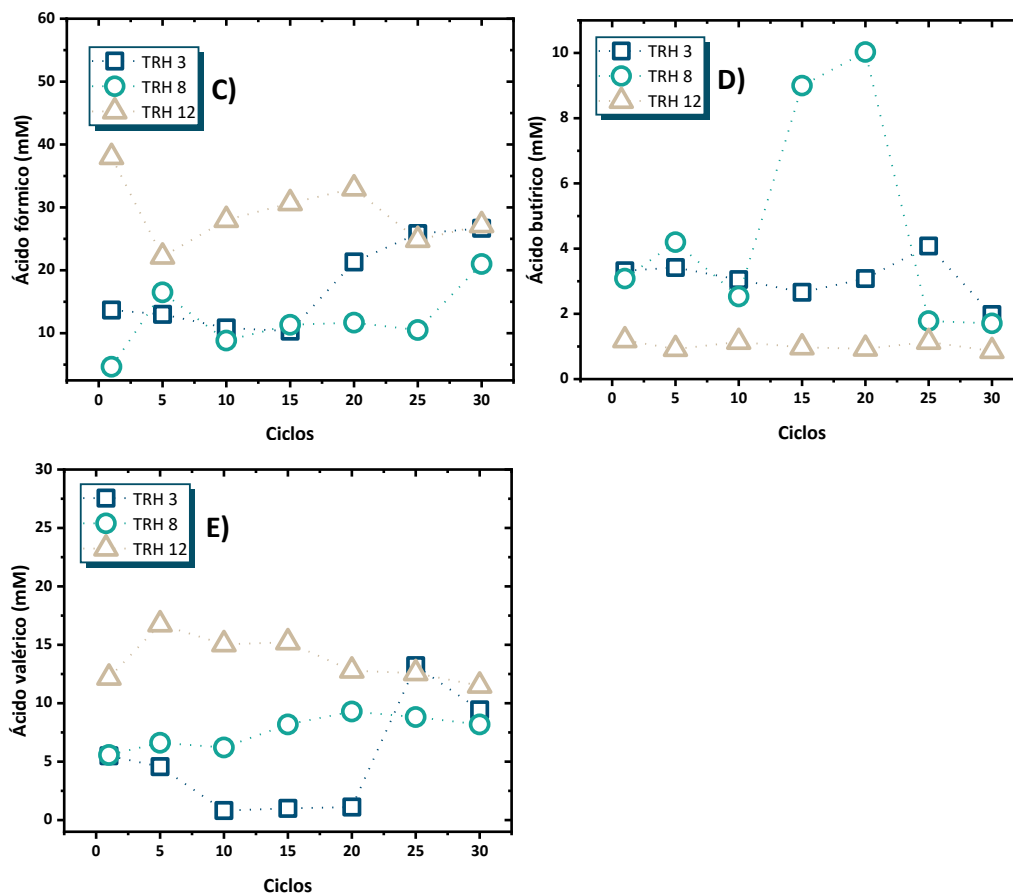


Figura 36. Producción de AGV's durante la fermentación oscura para TRH de 3, 8 y 12 h.

Otras especies como *Anaerococcus* del phylum *Firmicutes* se le atribuye la producción de ácidos débiles como ácido butírico, además de estar presentes microorganismos productores de hidrógeno como *Xanthomonas sp*, *Firmicutes clostridia* presente en el inóculo granular y que son conocidas por su capacidad de consumir algunos ácidos orgánicos y coadyuvar a la producción de hidrógeno [29].

4.7.3 Rendimiento del hidrógeno

La principal aplicación de la fermentación oscura es convertir la materia orgánica en hidrógeno por medio de bacterias fermentativas. Para evaluar la eficiencia de esta conversión se utiliza como índice el rendimiento de hidrógeno (HY por sus siglas en inglés) [124]. El máximo rendimiento que se obtuvo fue para el TRH 8 h, seguido del TRH 12 h y por último el TRH 3 h (véase **Figura 37**). Se obtuvo un rendimiento de hidrógeno para el TRH 8 h de $261.72 \text{ mL gSTV}^{-1}_{\text{removido}}$, para el ciclo 27, para el TRH 12 h de $71.19 \text{ mL gSTV}^{-1}_{\text{removido}}$, para el ciclo 29 y para el TRH 3 h de $62.80 \text{ mL gSTV}^{-1}_{\text{removido}}$, para el ciclo 30. Se obtuvo un rendimiento de hidrógeno para el TRH 8 h de $139.40 \text{ mL gDQO}^{-1}_{\text{removido}}$, para el ciclo 34, para el TRH 12 h de $103.44 \text{ mL gDQO}^{-1}_{\text{removido}}$.

¹_{removido}, para el ciclo 21 y para el TRH 3 h de 50.06 mL gDQO⁻¹_{removido}, para el ciclo 17. En la co-digestión que se utilizó en esta investigación obteniendo un mayor rendimiento fue para el TRH 8 h con un rendimiento de 139.40 mL gDQO⁻¹_{removido}, mayor que el de Tawfik *et al.* con un rendimiento de 118.6 ± 22.3 mL gDQO⁻¹_{removido} a partir de la co-digestión de agua residual de la industria de elaboración de galletas con agua residual doméstica a un TRH 12 h en un reactor híbrido anaerobio de flujo ascendente (UAHR por sus siglas en inglés) [125], una producción ligeramente mayor que pudiese ser atribuido al tamaño del reactor y que además se menciona que operar con un corto TRH beneficia al sistema de producción de hidrógeno como aquí puede ser observado [125].

Por otro lado Reyna-Gómez *et al.* evaluaron tres TRH (24, 12 y 6 h) con la co-digestión de residuos orgánicos provenientes de una mezcla de cáscaras de frutas como melón, papaya y piña con lodos primarios [20] en un reactor híbrido de flujo ascendente de lodos anaeróbicos utilizando la relación C/N 30, pH inicial de 5.5 a una temperatura de 35 °C y lodo granular como inóculo, presentando rendimientos de 650 ± 50 mL BH₂ g⁻¹_{DQO removidos} para TRH 24 h, 48 ± 4 mL BH₂ g⁻¹_{DQO removidos} para TRH 12 h y 20 ± 2 mL BH₂ g⁻¹_{DQO removidos} para TRH 6 h, sin embargo se presentaron valores bajos para los TRH de 12 y 6 h con respecto al rendimiento de esta investigación, quizá debido a la complejidad de los sustratos utilizados por Reyna-Gómez *et al.* Que al compararlo con la co-digestión de AR de la industria de panificación con el suero de queso, se obtuvo un rendimiento de hidrógeno para el TRH 8 h de 139.40 mL gDQO⁻¹_{removido}, siendo un rendimiento más alto comparado con la co-digestión de Reyna-Gómez *et al* en los TRH 12 y 6 h (48 ± 4 mL BH₂ g⁻¹_{DQO removidos} y 20 ± 2 mL BH₂ g⁻¹_{DQO removidos}, respectivamente).

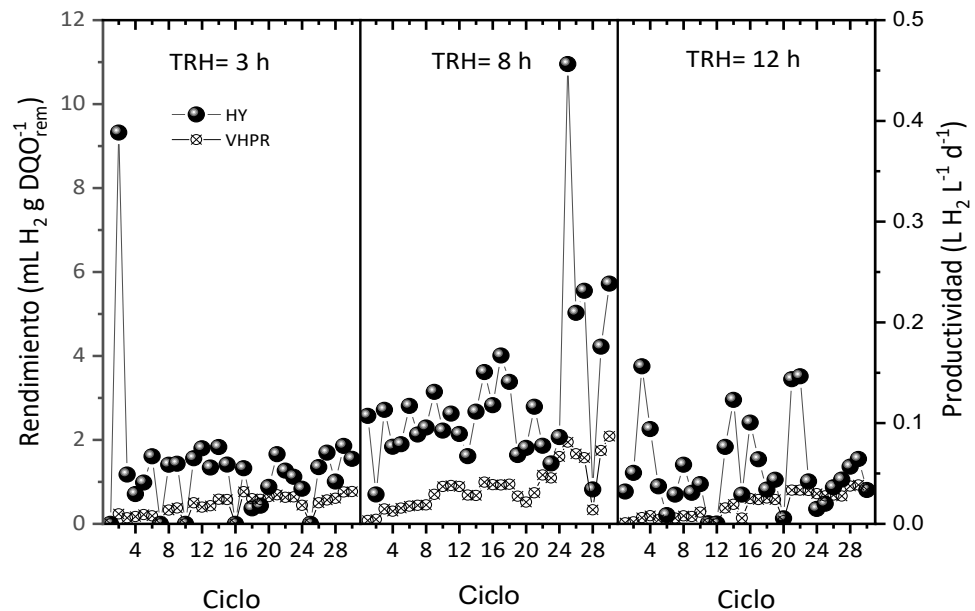


Figura 37. Rendimiento y productividad para los TRH de 3, 8 y 12 h durante 30 ciclos.

4.7.4 RAHFA con TRH 8 h durante 50 ciclos

En esta sección se presentan los resultados de la co-digestión HS-SS en el RAHFA operado a pH constante y TRH 8 h durante 50 ciclos. En la **Figura 38** se presentan los principales resultados y habrá que destacar que durante los primeros 20 ciclos se presentan las principales variaciones de pH, pero posterior a esta corrida y hasta 50 se observó la estabilidad del pH a 4 en el efluente. La producción de biogás de mantuvo de manera continua logrando producir 7500 mL. El porcentaje de hidrógeno en el biogás después del ciclo 30 fue en el intervalo de 39 a 59 %. Lo que prueba la aclimatación de los microorganismos productores de hidrógeno.

En lo que corresponde a la remoción de los carbohidratos totales, igualmente se observó un incremento en el intervalo de 70 a 90 % de remoción como resultado de la actividad microbiana. Para la demanda química de oxígeno igualmente se observó un incremento posterior al ciclo 30 alcanzando remociones entre 70 a 80 % en correspondencia con los resultados de una mejor aclimatación de las bacterias productoras de hidrógeno. Para el caso de los ST, STV y SST (no mostrados), estos parámetros se mantuvieron estables en el intervalo de 50 a 60 %, 70 -55 % y 80 – 90 % respectivamente.

A partir de los resultados presentados en esta sección queda mostrado la producción continua de hidrógeno empleando la co-digestión HS-SS, el reactor RAHFA. Además, también se evidencia que el inóculo granular es capaz de adaptarse a nuevas condiciones anaerobias además que sus características físicas reducen la atracción y en consecuencia el barrido de los sólidos.

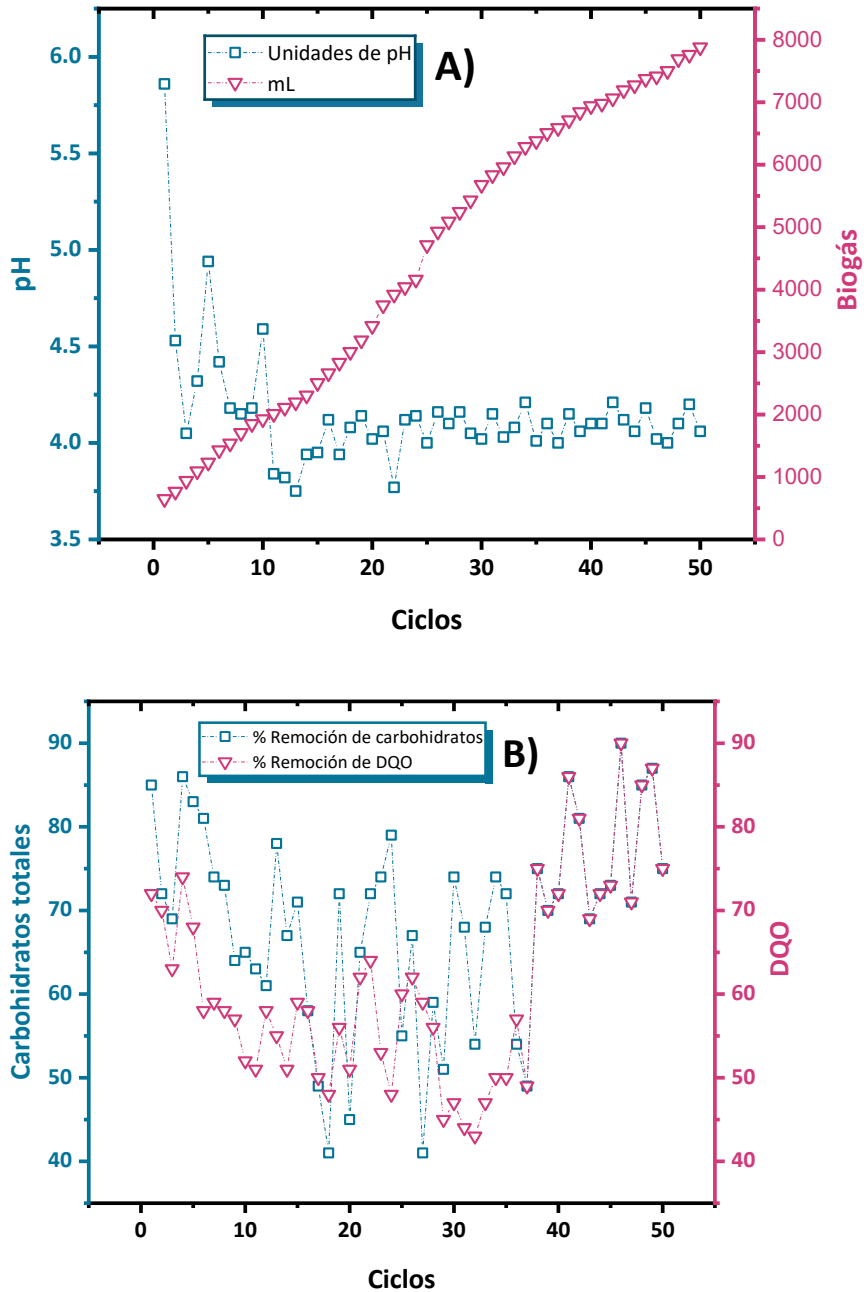


Figura 38. Medición de pH y biogás acumulado (A), remoción (%) de carbohidratos (B) y remoción (%) de DQO (B) para TRH de 8 h.

CAPÍTULO V

EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E INCERTIDUMBRE

5.1 Evaluación de parámetros de desempeño del método analítico por cromatografía de gases e incertidumbre

En este capítulo se presenta la evaluación de parámetros de desempeño del método analítico para la cuantificación de gases permanentes principalmente H₂ y AGV's (ácido acético, ácido butírico, ácido fórmico, ácido propiónico y ácido valérico). Para ello se hicieron curvas de calibración estableciendo rangos para cada analito a partir de una mezcla de gases para el caso del H₂ y de una solución con una mezcla de AGV's, el cual también permitió la determinación de los tiempos de retención. Una vez realizadas las curvas de calibración permitieron llevar a cabo los cálculos de las concentraciones para el hidrógeno y los AGV's. A continuación, se presentan las curvas de calibración para el hidrógeno y para los AGV's.

5.2 Cuantificación de gases permanentes, hidrógeno

Curva de calibración para el hidrógeno por cromatografía de gases con detector TCD a través de la ecuación de la recta con ajuste de los mínimos cuadrados. Lo valores obtenidos de la ecuación de la recta como la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el factor de correlación (R^2) son mostrados en la parte superior de cada curva de calibración.

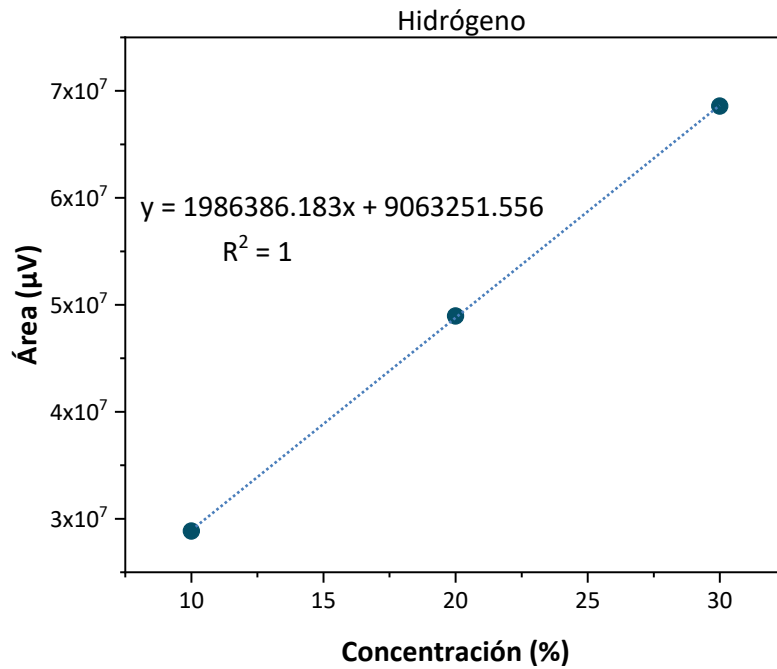


Figura 39. Curva de calibración para el H_2 en un rango de 10 a 30 %.

5.3 Cuantificación de AGV's

Curva de calibración para los AGV's (ácido acético, ácido propiónico, ácido fórmico, ácido butírico y ácido valérico) por cromatografía de gases con detector FID a través de la ecuación de la recta realizadas con las condiciones experimentales descritas en el apartado 3.5.2.

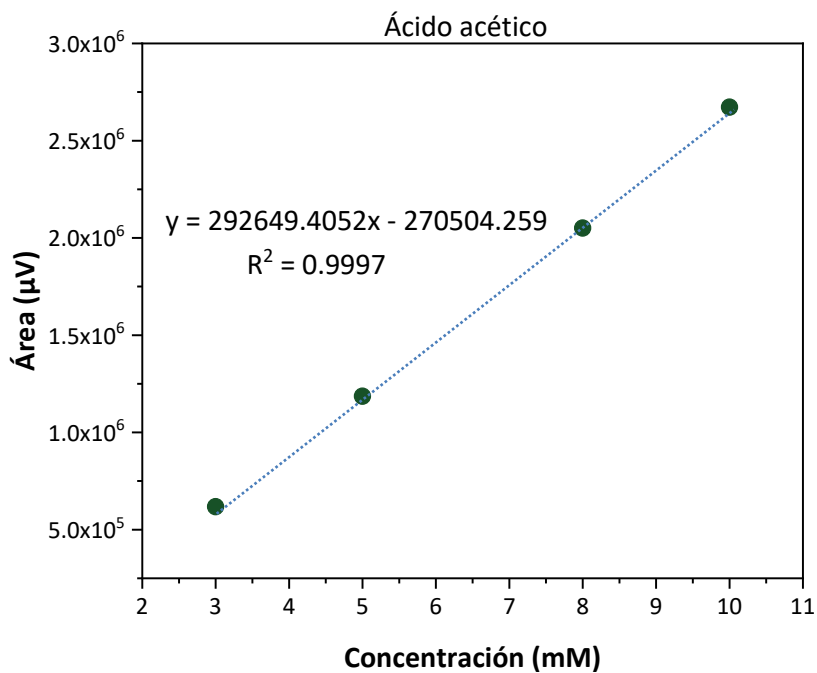


Figura 40. Curva de calibración para el ácido acético con un rango de 3 a 10 mM.

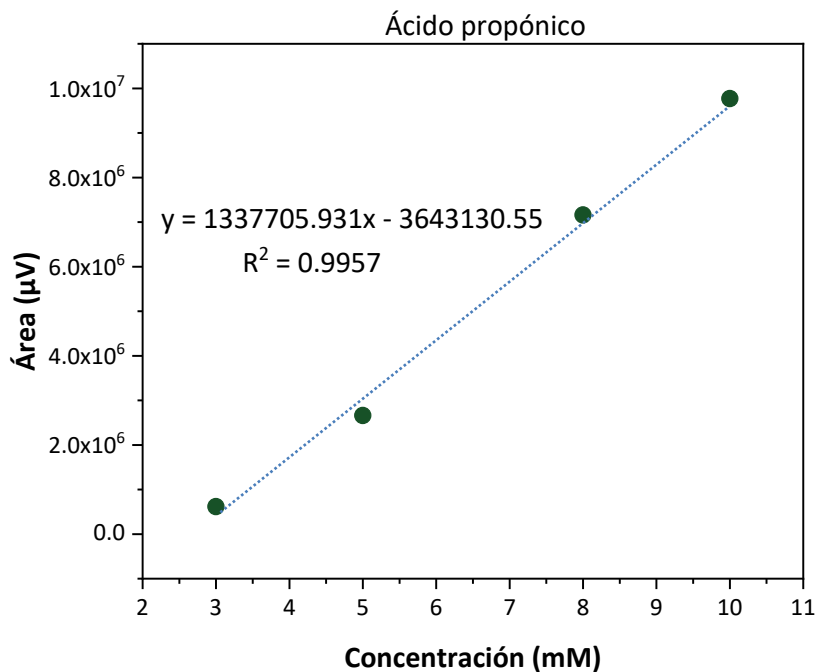


Figura 41. Curva de calibración para el ácido propiónico con un rango de 3 a 10 mM.

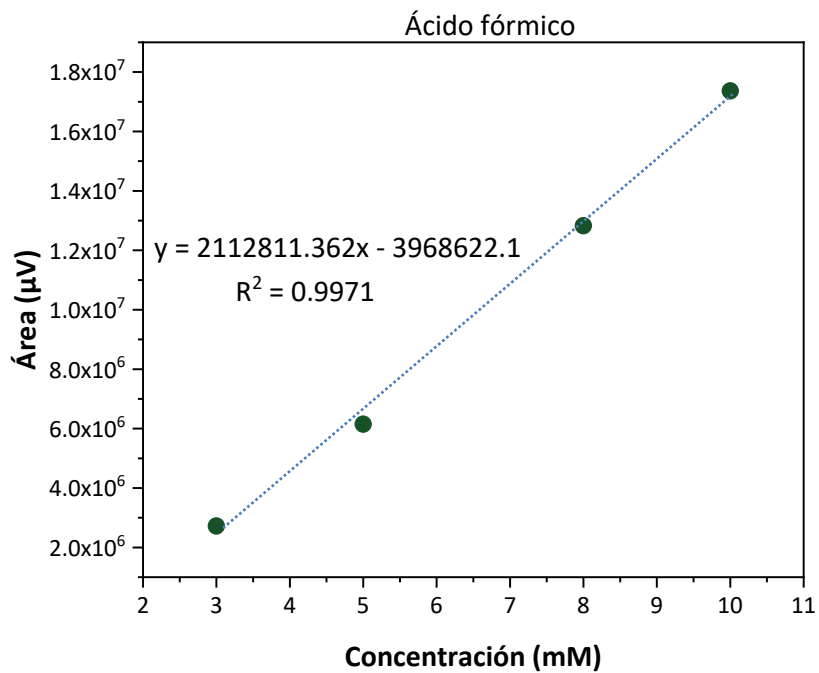


Figura 42. Curva de calibración para el ácido fórmico con un rango de 3 a 10 mM.

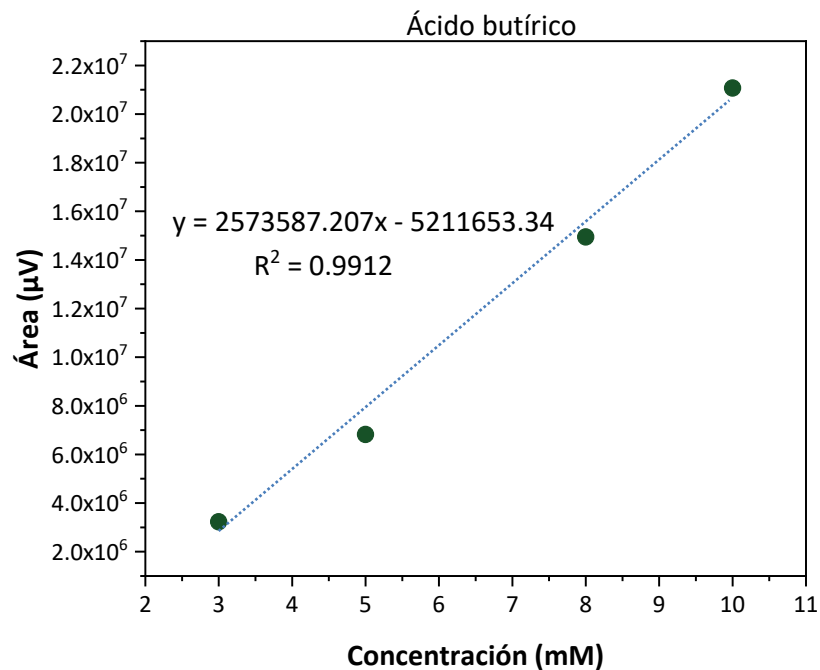


Figura 43. Curva de calibración para el ácido butírico con un rango de 3 a 10 mM.

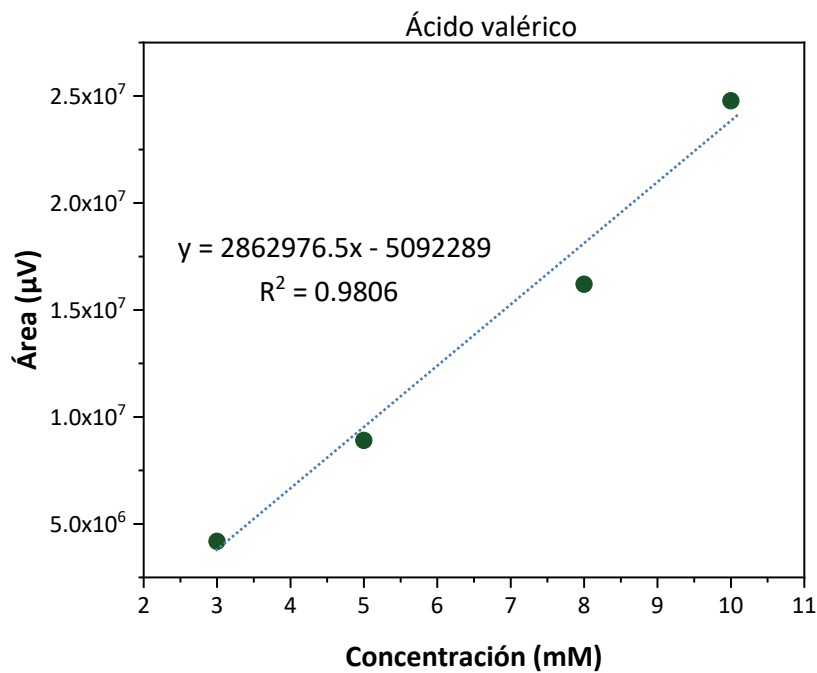


Figura 44. Curva de calibración para el ácido valérico con un rango de 3 a 10 mM.

5.4 Incertidumbre

Se obtuvieron los siguientes valores para las incertidumbres individuales o estándar (u), que son mostradas en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Valores de las incertidumbres individuales para la medición de hidrógeno.

Incertidumbre estándar (u)		
Sustratos	Disolución de harina	
	$u_{(\text{pesaje})}$	0.0014
	$u_{(\text{resolución balanza})}$	2.8867×10^{-5}
	$u_{(\text{matraz volumétrico 1L})}$	0.0002
Suero de queso		
	$u_{(\text{volumen})}$	0
Inóculo	Lodo granular	
	$u_{(\text{pesaje})}$	0.0003
	$u_{(\text{resolución balanza})}$	2.8867×10^{-5}
Reactivos	Disolución de nutrientes	
	$u_{(\text{pesaje})}$	0.0002
	$u_{(\text{resolución balanza})}$	2.8867×10^{-5}
	$u_{(\text{matraz volumétrico 1L})}$	0.0002
	Hidróxido de sodio 1N	
	$u_{(\text{pesaje})}$	0.0038
	$u_{(\text{resolución balanza})}$	2.8867×10^{-5}
	$u_{(\text{matraz volumétrico 1L})}$	0.0002
Muestra	pH	
	$u_{(\text{resolución de medidor de pH})}$	0.0029
	Análisis	
	$u_{(\text{resolución jeringa})}$	0.0144
	$u_{(\text{resolución cromatógrafo de gases})}$	0.2887

A partir de estas **incertidumbres estándar** se procedió a calcular la incertidumbre combinada obteniendo un valor de:

$$u_{\text{concentración } H_2} = 0.0015$$

Posteriormente se procedió a partir de la **incertidumbre combinada** calcular la incertidumbre expandida con un factor de cobertura (k) de 2 con 95.45% de nivel de confianza. Teniendo un valor de:

$$u_{\text{concentración } H_2} = 0.0029$$

Esta **incertidumbre expandida** se hizo para la cuantificación de H_2 del reactor 3 Ciclo 12 09092020 cuya concentración e incertidumbre se muestran a continuación:

Reactor 3 Ciclo 12092020, Concentración H_2 (%) = 67.9907 ± 0.002

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y

RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se llegaron a las siguientes conclusiones en este proyecto de investigación:

- En este proyecto de investigación se evaluaron dos tipos de co-digestiones utilizando agua residual de la industria de panificación con suero de queso (HS-SS) y agua residual de la industria de panificación con lodo primario (HS-HL) en un sistema tipo lote utilizando un diseño experimental 2^2 para evaluar las variables como las dos co-digestiones y las relaciones C/N 20, 30 y 40, teniendo como inóculo lodo granular, a $35\text{ }^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 6.0 \pm 0.1$. Donde la co-digestión HS-SS presentó un mayor rendimiento ($0.0043 \pm 0.0004\text{ mL H}_2\text{ gSTV}^{-1}_{\text{removido}}$) comparado con la co-digestión HS-HL, así como también se presentó una correlación superior a 0.90 con el modelo cinético de Gompertz.
- En base a la selección de la co-digestión de HS-SS como adecuada, permitió implementar la fermentación oscura a un reactor anaerobio de flujo ascendente (RAFA) y en un segundo reactor denominado reactor híbrido de flujo ascendente (RAFHA), evaluando tres TRH (3, 8 y 12 h) con la relación C/N 30, a $35\text{ }^\circ\text{C}$ y $\text{pH}_{\text{inicial}} = 6.0 \pm 0.1$.
- Los resultados más destacados y representativos fueron para el reactor RAFHA, cuyo reactor permitía una agitación continua por la distribución del inóculo en los platos, caso contrario para el reactor RAFA, el cual no fue posible mantener la agitación continua y además la precipitación de los sustratos desactivaban el reactor. Por lo que el diseño RAFHA a un TRH 8 h fue favorable demostrando un desempeño similar al RAFA con la diferencia principal con una mayor producción de biogás (Carbohidratos $69 \pm 8\%$, DQO de $56 \pm 7\%$, los sólidos totales $55 \pm 10\%$, sólidos totales volátiles $60 \pm 11\%$ y la producción de biogás de 5677 mL (30 ciclos) con un máximo porcentaje promedio de hidrógeno en biogás de 40% para RAFHA y Carbohidratos $76\% \pm 8$, DQO de $50\% \pm 7$, los sólidos totales $60 \pm 4\%$, sólidos totales volátiles $63 \pm 4\%$ y la producción de biogás de 840 mL (30 ciclos) con un máximo porcentaje promedio de hidrógeno en biogás de 43% para RAFHA).
- Otro punto importante que se presentó en el reactor RAFHA fue el tiempo de actividad en la FO, alcanzando 50 ciclos, que en los TRH 3 y 12 h la desactivación se presentó a los 30 ciclos. Esto se debe a las fluctuaciones de pH a lo largo de los ciclos

y además para el TRH 3 h se atribuyó al corto tiempo de aclimatación de los microorganismos productores de hidrógeno. A pesar de la adición de NaOH para amortiguar el pH de las co-digestiones, no fue favorable por lo que se recomienda que sea automático.

- Como en la mayor parte de la literatura se menciona que el pH favorecedor para la producción de hidrógeno se encuentra en el rango de 5.5-6.5, en este trabajo la mayor parte del tiempo fue de pH ácido (< 5.5) por la naturaleza tanto del suero de queso como del agua, sin embargo, otros autores también han logrado obtener hidrógeno con pH similares a este caso, cabe destacar que favorece que no se produzca metano por estos valores de pH.
- Llevar a cabo un análisis de perfil microbiológico permite conocer los microorganismos productores de hidrógeno presentes en la co-digestión HS-SS.

Referencias

- [1] Pérez-Denicia E., Fernández-Luqueño F., Vilariño-Ayala D., Montañó-Zetina L.M., Maldonado-López L.A. (2017) Renewable energy sources for electricity generation in Mexico: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 597-613.
- [2] B. P. Primary energy section from BP Statistical Review of World Energy June 2015. Página 41. <http://oilproduction.net/files/bp-statistical-review-of-world-energy-2015-full-report.pdf> (Accesado 12 de enero, 2021).
- [3] Vidal-Arao J. J., Østergaard P.A., Sheinbaum-Pardo C. (2015) Optimal energy mix for transitioning from fossil fuels to renewable energy sources – The case of the Mexican electricity system. *Applied Energy*, 150, 80-96.
- [4] Singh L., Wahid Z. A. (2015). Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 21, 70-80.
- [5] Zhang D., Vassiliadis, V. S. (2015) Chlamydomonas reinhardtii metabolic pathway analysis for biohydrogen production under non-steady-state operation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 54:43, 10593-10605.
- [6] SENER. Prospectiva del Sector Eléctrico 2015 – 2029. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/44328/Prospectiva del Sector Electrico.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/44328/Prospectiva_del_Sector_Electrico.pdf) (Accesado 12 de enero, 2021).
- [7] SENER. Prospectiva de Energías Renovables 2016 – 2030. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/177622/Prospectiva de Energ as Renovables 2016-2030.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/177622/Prospectiva_de_Energias_Renovables_2016-2030.pdf) (Accesado 12 de enero, 2021).
- [8] SENER. Programa sectorial derivado del plan nacional de desarrollo 2019-2024. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5596374&fecha=08/07/2020 (Accesado 12 de enero, 2021).
- [9] Periódico El País. <https://elpais.com/mexico/2020-09-10/la-termoelectrica-de-morelos-empezara-a-funcionar-antes-de-fin-de-ano-pese-a-las-dudas-de-los-pobladores.html> (Accesado 12 de enero, 2021).

- [10] Sarangi P. K., Nanda S. (2020) Biohydrogen production through dark fermentation. *Chemical & Engineering Technology*, 43:4, 601-612.
- [11] Bergen M., Mountford H. 5 Ways Momentum for Climate Action Has Grown Since the Paris Agreement Was Signed. <https://www.wri.org/blog/2020/04/5-ways-momentum-climate-action-has-grown-paris-agreement-was-signed> (Accesado el 02 de agosto, 2020).
- [12] Conacyt. Agenda de innovación de Zacatecas. Documentos de trabajo. <http://www.agendasinnovacion.org/wp-content/uploads/2015/03/4.2-Agenda-del-%C3%A1rea-Energias-Renovables.pdf> (Accesado el 12 de enero, 2021).
- [13] García C.A., Riegelhaupt E., Ghilardi A., Skutsch M., Islas J., Manzini F., Masera O. (2015). Sustainable bioenergy options for Mexico: GHG mitigation and costs. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 43, 542-552.
- [14] Cheng C.-L., Lo Y.-C., Lee K.-S., Lee D.-J., Lin, C.-Y., Chang J.-S. (2011) Biohydrogen production from lignocellulosic feedstock. *Bioresource Technology*, 102:18, 8514-8523.
- [15] Gupta V.K., Potumarthi R., O'Donovan A., Kubicek P., Sharma G. D., Tuohy M.G. (2014). Bioenergy research: An overview on technological developments and bioresources. *Bioenergy Research: Advances and Applications*, 23-47.
- [16] Sinbuathong, N., Somjit, C., Leungprasert, S. (2015) Feasibility study for biohydrogen production from raw brewery wastewater. *International Journal of Energy Research*. 39 (13), 1769-1777.
- [17] Saldaña Alarcón, A. (2020). Producción de biohidrógeno por fermentación oscura y enzimática previo tratamiento sonocáustico para la biomasa proveniente de una industria papelería. *Tesis de Licenciatura de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana*.
- [18] Castelló E., Nunes Ferraz-Junior A.D., Andreani C., Anzola-Rojas M. del P., Borzacconi L., Buitrón G., Carrillo-Reyes J., Damasceno Gomes S., Maintinguer S.I., Moreno-Andrade I., Palomo-Briones R., Razo-Flores E., Schiappacasse-Dasati M., Tapia-Venegas E., Valdez-Vazquez I., Vesga-Baron A., Zaiat M., Etchebehere C. (2019). Stability problems in the hydrogen production by dark

fermentation: Possible causes and solutions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119, 109602.

[19] Pandey A., Srivastava S., Rai P., Duke M. (2019). Cheese whey to biohydrogen and useful organic acids: A non-pathogenic microbial treatment by *L. acidophilus*. *Scientific Reports*, 9 (1).

[20] Reyna-Gómez L. M., Molina-Guerrero C. E., Alfaro J. M., Suárez Vázquez S. I., Robledo-Olivo A., Cruz-López 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.

[21] De Gioannis G., Friargiu M., Massi E., Muntoni A., Polettini A., Pomi R., Spiga D. (2014). Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39:36, 20930-20941.

[22] Wang H., Xu J., Sheng L., Liu X., Lu Y., Li W. (2018). A review on bio-hydrogen production technology. *International Journal of Energy Research*, 42:11, 3442-3453.

[23] Subhedar P. B., Babu N. R., Gogate P. R. (2015) Intensification of enzymatic hydrolysis of waste newspaper using ultrasound for fermentable sugar production. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 326-332.

[24] Kozłowski K., Lewicki A., Malińska K., Wei Q. (2019). Current state, challenges and perspectives of biological production of hydrogen in dark fermentation process in Poland. *Journal of Ecological Engineering*, 20:2, 146-160.

[25] Kuna E., Behling R., Valange S., Chtael G., Colmenares J.C. (2017). Sonocatalysis: A potential sustainable pathway for the valorization of lignocellulosic biomass and derivatives. *Top Curr Chem (Z)*; 375, 41.

[26] Gomez-Romero J., Gonzalez-Garcia A., Chairez I., Torres 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).

[27] Lateef S. A., Beneragama N., Yamashiro T., Iwasaki M., Ying C., Umetsu K. (2012). Biohydrogen production from co-digestion of cow manure and waste milk under thermophilic temperature. *Bioresource Technology*, 110, 251-257.

- [28] El agua en México: Cauces y encauces. CONAGUA. (2010). <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Contenido/Documentos/elaguaenmexico-caucesyencauces.pdf> (Accesado el 16 de agosto, 2020).
- [29] Cruz Méndez, A. (2021). Producción de biohidrógeno a partir de una codigestión anaerobia utilizando agua residual de la industria alimenticia en un reactor continuo empleando consorcios microbianos mixtos. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- [30] Pais-Chanfrau J. M., Núñez-Pérez J., Espin-Valladares R. del C., Lara-Fiallos M. V., Trujillo-Toledo, L. E. (2020). Bioconversion of lactose from cheese whey to organic acids, lactose and lactose derivatives. *IntechOpen*. 1-22.
- [31] Latin American baking industry undergoing significant transformation. http://digitalbs.bakingbusiness.com/sosland/bs/2019_06_01/index.php#/p/1 (Accesado el 12 de enero, 2021).
- [32] Statista. Most wasted foods in Mexico in 2017, by type of product. <https://www.statista.com/statistics/864035/volume-wasted-food-product-mexico/> (Accesado el 12 de enero, 2021).
- [33] Immonen M., Maina N. H., Wang Y., Coda R., Katina K. (2020). Waste bread recycling as a baking ingredient by tailored lactic acid fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 327, 10852.
- [34] Adessi A., Venturi M., Candelieri F., Galli V., Granchi L., De Philippis R. (2018) Bread wastes to energy: Sequential lactic and photo-fermentation for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43:20, 9569-9576.
- [35] Han W., Huang J., Zhao H., Li Y. (2016). Continuous biohydrogen production from waste bread by anaerobic sludge. *Bioresource Technology*; 212, 1-5.
- [36] Guang, Y., Wang, J. (2017). Fermentative hydrogen production from sewage sludge. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 47:14, 1219-1281.
- [37] Senturk I., Buyukgungor H. (2019) Thermophilic dark fermentation of sewage sludge for biohydrogen production-influence of pH. *Global NEST Journal*. 20 :3, 564-571.

- [38] Tena M., Luque B., Perez M., Solera R. (2020) Enhanced hydrogen production from sewage sludge by cofermentation with wine vinasse. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45, 15977-15984.
- [39] Diamantis V., Eftaxias A., Stamatelatos K., Noutsopoulos C., Vlachokostas C., Aivasidis A. (2021). Bioenergy in the era of circular economy: Anaerobic digestion technological solutions to produce biogas from lipid-rich wastes. *Renewable Energy*, 168, 438-447.
- [40] Vlachokostas C. (2020). Closing the loop between energy production and waste management: a concept approach towards sustainable development. *Sustainable*. 12:15, 5995.
- [41] Barquera R., Bravo-Acevedo A., Clayto S., Rodríguez Munguía T. J., Hernández-Zaragoza D.I., Adalid-Sáinz C., Arrieta-Bolaños E., Aquino-Rubio G., González-Martínez M. del R., Lona-Sánchez A., Martínez-Álvarez, J. C., Arrazola-García M. A., Delgado-Aguirre H., González-Medina L., Pacheco-Ubaldo H., Juárez-Barreto V., Benítez-Arvizu G., Escareño-Montiel N., Juárez de la Cruz F., Jaramillo-Rodríguez Y., Salgado-Adame A., Zúñiga J., Yunis E. J., Bekker-Méndez C., Granados J. (2019). Genetic diversity of HLA system in two populations from Nuevo León, Mexico: Monterrey and rural Nuevo León. *Human Immunology*. 81:9, 516-518.
- [42] Presentación de resultados, Nuevo León. INEGI. Censo 2020 de Población y Vivienda. https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/ccpv/2020/doc/cpv2020_pres_res_nl.pdf (Accesado 26 de junio, 2021).
- [43] Chen J. P., Yang L., Bai R., Hung Y. -T. (2006). Bakery waste treatment. Taylor & Francis Group, LLC. 271-289.
- [44] Liu Y., Lin R., Man, Y., Ren J. (2019). Recent developments of hydrogen production from sewage sludge by biological and thermochemical process. *International Journal of Hydrogen Energy*. 19676-19697.
- [45] Khairul Anuar N., Che Man, H., Idrus S., Nik Daud N. N. (2017). Biochemical methane potential (BMP) from anaerobic co-digestion of sewage sludge and decanter cake. *The Wood and Biofiber International Conference*. 368, 012027.

- [46] Yang Q., Wu B., Yao F., He L., Chen F., Ma Y., Shu X., Hou K., Wang D., Li X. (2019). Biogas production from anaerobic co-digestion of waste activated sludge: so-substrates and influencing parameters. *Environ Sci Biotechnol*.
- [47] Chandrasekhar, K., Kumar, S., Lee, B.-D., Kim, S.-H. (2020). Waste based hydrogen production for circular bioeconomy: Current status and future directions. *Bioresurce Technology*. 30, 122920.
- [48] Gómez-Camacho C. E., Pellicer Alborch K. Bockish A., Neubauer P., Junne S., Ruggeri B. (2020). Monitoring the physiological state in the dark fermentation of maize/grass silage using flow cytometry and electrooptic polarizability measurements. *BioEnergy Research*.
- [49] P. M. Usman, T. M. Rajesh Banu, J. Gunasekaran, Kumar, G. (2019). Biohydrogen production from industrial wastewater: An overview. *Bioresource Technology Reports*, 7, 102287.
- [50] Baeyens J., Zhang H., Nie J., Appels L., Dewil R., Ansart R., Deng Y. (2020). Reviewing the potential of bio-hydrogen production by fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 131, 110023.
- [51] Rodrigues Ramos, L., Luiz Silva, E. (2018). Continuous hydrogen production from cofermentation of sugarcane vinasse and cheese whey in a thermophilic anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*., 43, 13081-13089.
- [52] Lovato G. Lazaro C. Z., Zaiat M., Ratusznei S. M., Rodrigues J. A. D. (2017). Biohydrogen production by co-digestion whey and glycerin in an AnSBBR: Performance optimization, metabolic pathway kinetic modeling and phylogenetic characterization. *Biochemical Engineering Journal*. 128, 93-105.
- [53] Yang G., Wang, J. (2019). Biohydrogen production by co-fermentation of sewage sludge and grass residue: Effect of various substrate concentrations. *Fuel*. 237, 1203-1208.
- [54] Tena M., Perez, M., Solera, R. (2019). Effects of several inocula on the biochemical hydrogen potential of sludge-vinasse co-digestion. *Fuel*. 258, 116180.
- [55] Kamyab S., Ahmad Ataei S., Tabatabaee M., Abolghasem Mirhosseinei S. (2019). Optimization of bio-hydrogen production in dark fermentation using activated sludge and date syrup as inexpensive substrate. *International Journal of Green Energy*, 16:10, 763-769.

- [56] Li Z., Chen Z., Ye H., Wang Y., Luo W., Chang J.-S., Li, Q., He N. (2018). Anaerobic co-digestion of sewage sludge and food waste for hydrogen and VFA production with microbial community analysis. *Waste Management*. 78, 789-799.
- [57] Nasr M., Tawfik A., Ookawara S., Suzuki M., Kumari S., Bux F. (2014). Continuous biohydrogen production from starch wastewater via sequential dark-photo fermentation with emphasize on maghemite nanoparticles. *Journal of Industrial Engineering Chemistry*.
- [58] Vendruscolo F. (2015). Starch: a potential substrate for biohydrogen production. *International Journal of Energy Research.*, 39:293-302.
- [59] Oswald, U. (2017). Seguridad, disponibilidad y sustentabilidad energética en México. *Revista Mexicana de Ciencias Políticas y Sociales*. 230, 155-196.
- [60] Ranjan Das, S.R., Basak, N. (2020). Molecular biohydrogen production by dark and photo fermentation from wastes containing starch: recent advancement and future perspective. *Bioprocess and Biosystems Engineering*.
- [61] Silva Rodríguez de San Miguel, J.A. (2019). Energía renovable en México: Retos y oportunidades. *Espacios.*, 40, 25, 29.
- [62] Pérez-Denicia, E., Fernández-Luqueño, F., Vilariño-Ayala, D., Montaña-Zetina, L.M., Maldonado-López, L.A. (2017). Renewable energy sources for electricity generation in Mexico: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 78, 597-613.
- [63] Vi, L.V.T., Salakkam, A., Reungsang, A. (2017). Optimization of key factors affecting biohydrogen production from sweet potato starch. *Energy Procedia.*, 138, 973-978.
- [64] Wang, J., Yin, Y. (2017). Biohydrogen production from organic wastes. *Green Energy and Technology*.
- [65] Mishra, P., Krishnan, S., Rana, S., Singh, L., Sakinah, M., Ab Wahid, Z. (2019). Outlook of fermentative hydrogen production techniques: An overview of dark, photo and integrated dark-photo fermentative approach to biomass. *Energy Strategy Reviews.*, 24, 27-37.
- [66] Noussan, M., Raimondi, P.P., Scita, R., Hafner, M. (2020). The role of green and blue hydrogen in the energy transition-A technological and geopolitical perspective. *Sustainability*. 13 (298), 1-26.

- [67] Sangyoka S., Reungsang A., Lin C.Y. (2016) Optimization of biohydrogen production from sugarcane bagasse by mixed cultures using a statistical method. *Sustainable Environment Research*, 26, 235-242.
- [68] Basak N., Das D. (2007). The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art. *World J Microbiol Biotechnol.*, 23, 31-42.
- [69] Osman A. I., Deka T. J., Baruah D. C., Rooney D. W. (2020) Critical challenges in biohydrogen production processes from the organic feedstocks. *Biomass Conversion and Biorefinery*.
- [70] Ambaye T. G., Rene E. R., Dupont C., Wongrod S. van Hullebusch, E. D. (2020) Anaerobic digestion of fruit waste mixed with sewage sludge digestate biochar: Influence on biomethane production. *Frontiers in Energy Research*, 8:31.
- [71] Sotelo Navarro, P. X. Producción de bioH₂ por fermentación oscura a partir de pañales desechables usados. Tesis. 2017, 3-4.
- [72] Murugan Ramu S., Thulasinathan B., Gujuluva Hari D., Bora A., Jayabalan T., Naina Mohammed S., Doble M., Arivalagan P., Alagarsamy A. (2020). Fermentative hydrogen production and bioelectricity generation from food based industrial waste: An integrative approach. *Bioresource Technology*, 310, 123447.
- [73] Weide T., Hernández Regalado R. E., Brüggling E., Wichern M., Wetter C. (2020) Biohydrogen production via dark fermentation with pig manure and glucose using pH-dependent feeding. *Chemical Engineering Technology*, 43:8, 1578-1587.
- [74] Lay C. -H., Wu J. -H., Hsiao C. -L., Chang J. -J., Chen C. -C., Lin C. -Y. (2010) Biohydrogen production from soluble condensed molasses fermentation using anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 13445-13451.
- [75] Balachandar G., Khanna N., Das D., (2013) Biohydrogen production from organic wastes by dark fermentation. *Biohydrogen*. 103-144.
- [76] Prakash J., Sharma R., Ray S., Koul S., Chandra Kalia, V. (2018). Wastewater: A potential bioenergy resource. *Indian J Microbiol.*, 58(2):127137.

- [77] Wang S., Zhang, T, Bao, M., Su, H., Xu, P. (2019). Microbial production of hydrogen by mixed culture technologies: a review. *Biotechnology Journal*. 1, 15.
- [78] Cabrol L., Marone A., Tapia-Venegas E., Steyer J. -P., Ruiz-Filippi G., Trably E. (2017) Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocess: useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiology Reviews*, 41, 158-181.
- [79] Bethoux O. (2020) Hydrogen fuel cell road vehicles: State of the art and perspectives. *Energies*. 13, 5843.
- [80] Barca C., Ranava D., Bauzan M., Ferrasse J.-H., Giudici-Orticoni M. -T., Soric A. (2016). Fermentative hydrogen production in an up-flow anaerobic biofilm reactor inoculated with a co-culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Desulfovibrio vulgaris*. 221, 526-533.
- [81] Li Y., Qiu Y., Zhang X., Zhu M., Tan W. (2019). Strain screening and optimization of biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* EB-06 from glycerol fermentation. *Bioresources and Bioprocessing*, 6, 15.
- [82] Junyapoon S., Buala W., Phunpruch S. (2011). Hydrogen production with *Escherichia coli* isolated from municipal sewage sludge. *Science & Technology Asia*, 16:1, 9-15.
- [83] Madigan M. T., Martinko J. M., Bender K. S., Buckley D. H., Stahl D. A. (2015). Biología de los microorganismos. *Pearson*. 14^a. Edición. 86-88.
- [84] Blanco Londoño S. A. (2013). Producción de biohidrógeno a través de la fermentación oscura de residuos – Revisión crítica. Tesis., 16-17.
- [85] Braz Romão B., Moreira Silva F. T., de Barcelos Costa H. C., Santos Moreira F., de Souza Ferrerira J., Batista X. F.R., Luiz Cardoso V. (2017). pH control on the hydrogen production by microbial consortium. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 37:1, 505-512.
- [86] Mao C., Feng Y., Wang X., Ren G. (2015) Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 45, 540-555.
- [87] Ruggeri B., Tommasi T., Sanfilippo S. (2015). Ecological mechanisms of dark H₂ production by a mixed microbial community. In: BioH₂ & BioCH₄ through anaerobic digestion. *Green energy and technology*. Springer, London.

- [88] Toledo-Alarcón J., Capson-Tojo G., Marone A., Paillet F., Nunes Ferraz Júnior A.D., Chatellard, L., Bernet N., Trably E. (2018). Chapter 6. Basics of bio-hydrogen production by dark fermentation. *Bioreactors for Microbial Biomass and Energy Conversion*.
- [89] Magrini F. E., de Almeida G M., da Maia Soares D., Fuentes L., Etchebehere C., Luiz Beal L., Moura da Silveira M., Paesi S. (2020). *Biomass Conversion and Biorefinery*.
- [90] Bastidas-Oyanedel J. -R., Bonk F., Hedegaard Thomsen M., Ejbye Schmidt J. (2019). The future perspectives of dark fermentation: moving from only biohydrogen to biochemical. *Biorefinery*.
- [91] Alibardi L., Cossu R. (2016). Effects of carbohydrate, protein and lipid content of organic waste on hydrogen production and fermentation products. *Waste Management*, 47, 69-77.
- [92] Gonzalez-Ugalde C., Durán-Herrera J. E. (2014). Producción de hidrógeno a partir del tratamiento anaerobio de vinazas en un reactor UASB. *Tecnología en Marcha.*, 27,3, 3-12.
- [93] CONAGUA, *Manual de Agua Potable , Alcantarillado y Saneamiento Diseño de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales: Reactores Anaerobios de Flujo Ascendente*. <http://aneas.com.mx/wp-content/uploads/2016/04/SGAPDS-1-15-Libro25.pdf> (Accesado 2 de julio, 2021).
- [94] Lorenzo Acosta Y., Domenech López F., Gallardo Capote M., Rojas Sariol L., Eng Sánchez F., Chanfón J., Fernández R. (2014). Producción de bioenergía a partir del tratamiento anaerobio de vinazas de destilerías en reactores UASB. *Centro Azúcar*. 2223-461.
- [95] Pineda Muñoz C. F. (2015). Producción de hidrógeno mediante fermentación oscura de lixiviados orgánicos en un reactor UASB. *Tesis*. 41-42. Universidad Politécnica de Pachuca.
- [96] Hernández D. M., del Pilar Hurtado, L.A., Rodríguez-Chaparro, A. T. (2018). Hydrogen production in a novel configuration of UASB reactor under different hydraulic retention time. *DYNA*. 85:205, 157-162. X6 26.
- [97] PROY-NMX-003/3-SCFI-2008. Aguas residuales. Muestreo. Parte 3 Guía para el muestreo de aguas residuales. <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/AA/proy0909/proy-nmx-aa-003-3-scfi008.pdf> (Accesado 07 de abril, 2021).

[98] ISO 5667 – 10:1992. Water quality – Sampling –Part 10: Guidance on sampling of waste waters.

[99] NOM-004-SEMARNAT-2002. Lodos y biosólidos. Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/ecol/semarnat004.pdf> (Accesado 03 de enero, 2021).

[100] Guide to the Biosolids Risk Assessments for the EPA Part 503 Rule. EPA 832-B-93-005. Septiembre 1995.

[101] NMX-AA-008-SCFI-2016. Medición del pH en aguas naturales, residuales y residuales tratadas, método de prueba. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166767/NMX-AA-008-SCFI-2016.pdf> (Accesado 03 de enero, 2021).

[102] ISO 10523:2008. Water quality – Determination of pH.

[103] DuBois M., Gilles K., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 350-356.

[104] NMX-AA-030-SCFI-2001. Determinación de la demanda de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba. <https://agua.org.mx/wp-content/uploads/2011/01/nmx-aa-030-scfi-2001.pdf> (Accesado 03 de enero, 2021).

[105] ASTM D-1252-83. “Standard Test Method for Chemical Oxygen Demand in Water”, American Society for Testing Materials, USA, ASTM Committee on Standards, Philadelphia PA, vol. 11.02, pp 62-68, 1994.

[106] Método 5220-C. “Chemical Oxygen Demand” “Closed Reflux, Colorimetric Method”, American Public Health Association, “Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater”, American Public Health Association, United States of America, Washington, DC 200005, 19th Edition 1995, pp. 5-12, 5-16.

[107] Nitrogen, Total. Persulfate Digestion Method 10072. [file:///C:/Users/Alejandra%20Mina/Downloads/DOC316.53.01085%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Alejandra%20Mina/Downloads/DOC316.53.01085%20(1).pdf) (Accesado 03 de enero, 2021).

- [108] NMX-AA-034-SCFI-2015. Medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166146/nmx-aa-034-scfi-2015.pdf> (Accesado 03 de enero, 2021).
- [109] ISO 11923:1997. Water quality. Determination of suspended solids by filtration through glass-fiber filters.
- [110] 2540 Solids, Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, United States of America, Washington, DC 20005, 22th Edition 2012.
- [111] Gadhamshetty V., Arudchelvam Y., Nirmalakhandan N., Johnson D. C. (2010). Modeling dark fermentation for biohydrogen production: ADM1-based model vs. Gompertz model. *International journal of hydrogen energy*. 35, 479-490.
- [112] Kumar B., Dwivedi S., Agarwal D. D. (2016). A review: GC method development and validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 6:1, 1-7.
- [113] Zuo H. -L., Yang F. -Q., Huang W. -H., Xia Z. -N. (2013). Preparative gas chromatography and its applications. *Journal of Chromatographic Science*. 51:704-715.
- [114] Drolc A., Djinović P., Pintar A. (2013). Gas chromatography analysis: method validation and measurement uncertainty evaluation for volume fraction measurements of gases in simulated reformat gas stream. *Accred Qual Assur*. 18:225-233.
- [115] Centro Nacional de Metrología. Entidad Mexicana de Acreditación. (2008). Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. http://consultaema.mx:75/pqtinformativo/GENERAL/Clinicos/Carpeta_2_Criterios_evaluacion/CLINICOS_Validacion-Verificacion.pdf (Accesado 20 de marzo, 2021).
- [116] Zuas O., Mulayana M. R., Budiman H. (2016). Analytical method validation of GC-FID for the simultaneous measurement of hydrocarbons (C₂ – C₄) in their gas mixture. *Revista Colombiana de Química*. 45:3, 22-27.
- [117] Entidad Mexicana de Acreditación, A.C. Temas selectos de Calidad en Serología (aplicación en el banco de sangre). Validación y verificación de métodos de examen cuantitativos.

<file:///C:/Users/Alejandra%20Mina/Downloads/Validacio%CC%81n%20y%20verificacion%20de%20metodos%20de%20examen%20cuantitativos.pdf> (Accesado 20 de marzo, 2021).

[118] Uribe López M. del C., López Vidal R., Ramos Mayo C. P. (2013). Validación de métodos analíticos en laboratorios de ensayo de aguas residuales. *Revista de Divulgación de la División Académica de Ciencias Biológicas*. 11-18.

[119] Miller N. J. & Miller J. C. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Pearson Education, S.A.

[120] Morales-Ramírez A. de J., Rángel-Salinas E., Ramírez-López A., Dorantes-Rosales H. J. (2012). Metodología para el cálculo de la incertidumbre en la determinación de cobre por espectroscopía de absorción atómica. *Avances en Ciencias y Tecnología*. 3:4, 143-155.

[121] Schmid W. A., Lazos Martínez R. J. (2014). Guía para estimar la incertidumbre de la medición. CENAM. 4.

[122] Guía técnica sobre trazabilidad metrológica e incertidumbre de medida en los servicios de calibración de recipientes volumétricos por el método gravimétrico. (2016). CENAM.

[123] Martin del Campo, J.M. Evaluación de la incertidumbre en datos experimentales. (Accesado 21 de octubre, 2021).

[124] Yang G., Wang J. (2017). Co-fermentation of sewage sludge with ryegrass for enhancing hydrogen production: Performance evaluation and kinetic analysis. *Bioresource Technology*. 243, 1027-1036.

[125] Tawfik A., Ali M., Danial A., Zhao S., Meng F., Nasr M. (2021) 2-biofuels (H₂ and CH₄) production from anaerobic digestion of biscuits wastewater: Experimental study and techno-economic analysis. *Journal of Water Process Engineering*. 39, 101736.

[126] Struk-Sokolowska J. (2018). Variability of dairy wastewater characteristics in Piatnica – one of the largest and most advanced milk processing plants in Poland. *E3S Web of Conferences*. 44, 00169.

- [127] Escalante-Hernández H., Castro-Molano L., Besson V., Jaimes-Estévex J. (2017). Feasibility of the anaerobic digestion of cheese whey in a plug flow reactor (PFR) under local conditions. *Ingeniería Investigación y Tecnología*. XVIII, 3.
- [128] Zagklis D., Papadionysiou M., Tsigkou K., Tsafrajidou P., Zafiri C. Kornaros M. (2021) Effect of pH on the economic potential of dark fermentation product from used disposable nappies and expired food products. *Applied Sciences*. 11, 4099, 1-12.
- [129] Montecchio, D., Yuan, Y., Malpei, F. (2018) Hydrogen production dynamic during cheese whey Dark Fermentation: New insights from modelization. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43, 17588-17601.
- [130] Redondas Monteserín V. (2013). Obtención de hidrógeno mediante fermentación oscura de residuos de comida y lactosuero. Tesis de doctorado. Universidad de León, Instituto de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Biodiversidad.
- [131] Rafieenia R., Pivato A., Schievano A., Lavagnolo M. C. (2018). Dark fermentation metabolic models to study strategies for hydrogen consumers inhibition. *Bioresource Technology*. 267, 445-457.
- [132] Arias González, E. F., Rodríguez Bohórquez, C. L. (2012) Estudio de la producción de hidrógeno en régimen batch con agua residual proveniente de la industria cervecera. Tesis de licenciatura.
- [133] Cruz-Méndez A., Reyna-Gómez L. M., Suárez-Vázquez S. I., Cruz-López A. (2020). Effects of the inoculum source on biohydrogen production from brewery wastewater and cheese whey codigestion. *Waste and Biomass Valorization*. 1-26.
- [134] Zhu H., Parker W., Basnar R., Proracki A., Falletta P., Béland M., Seto P. (2009). Buffer requirements for enhanced hydrogen production in acidogenic digestion of food wastes. *Bioresources Technology*. 100, 5097-5102.
- [135] Sarkar O., Rova U., Christakopoulos P., Matsakas L. (2021). Influence of initial uncontrolled pH on acidogenic fermentation of brewery spent grains to biohydrogen and volatile fatty acids production: Optimization and scale-up. *Bioresource Technology*. 319, 124233.

[136] Łukajtis R., Hołowacz I., Kucharska K., Glinka M., Rybarczyk P., Przyjazny A., Kamiński M. (2018). Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 91, 665-694.

[137] Tonello T. U., Andreani C. L., Mari A. G., Fernandes J. R., Gomes S. D. (2018). Biohydrogen production in AnSBBR in fed-batch from starch effluent: influence organic load. *Engenharia Agrícola*. 38:5, 768-775.

[138] Bethoux O. (2020). Hydrogen fuel cell road vehicles: State of the art and perspectives. *Energies*. 13, 5843.