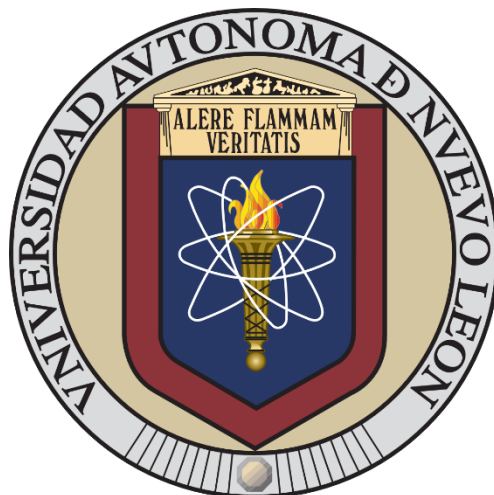


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL



**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOH_2 EN UN
BIORREACTOR PREVIO TRATAMIENTO POR
SONOQUÍMICA Y CONTROL DE LA ACTIVIDAD
MICROBIOLÓGICA**

POR

ROBERTO CARLOS CAMPOS FLORES

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
INGENIERÍA AMBIENTAL**

SEPTIEMBRE DE 2022



FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL

FECHA: 2022/09/08

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

Estimado Dr. Fajardo San Miguel,

Por medio de la presente, hago de su conocimiento que he finalizado la revisión del documento de **TESIS**, cuyo título es **"EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOH₂ EN UN BIORREACTOR PREVIO TRATAMIENTO POR SONOQUÍMICA Y CONTROL DE LA ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA"**, que presenta el **LBG. ROBERTO CARLOS CAMPOS FLORES**, como requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS**, del programa **MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL**.

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

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

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

Atentamente,

DR. ARQUÍMEDES CRUZ LOPEZ



Evaluador



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Av. Pedro de Alba S/N Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, C.P. 66455

81 8329 4000 ext. 4060 • www.fic.uanl.mx



FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL

FECHA: 2022/09/12

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

Estimado Dr. Fajardo San Miguel,

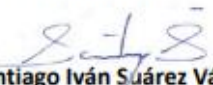
Por medio de la presente, hago de su conocimiento que he finalizado la revisión del documento de **TESIS**, cuyo título es **"EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOH₂ EN UN BIORREACTOR PREVIO TRATAMIENTO POR SONOQUÍMICA Y CONTROL DE LA ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA"**, que presenta el **LBG. ROBERTO CARLOS CAMPOS FLORES**, como requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS**, del programa **MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL**.

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

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

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

Atentamente,


Dr. Santiago Iván Suárez Vázquez
Evaluador



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Av. Pedro de Alba S/N Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, C.P. 66455
81 8329 4000 ext. 4060 • www.fic.uanl.mx



FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL

FECHA: 2022/09/06

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

Estimado Dr. Fajardo San Miguel,

Por medio de la presente, hago de su conocimiento que he finalizado la revisión del documento de **TESIS**, cuyo título es **"EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOH₂ EN UN BIORREACTOR PREVIO TRATAMIENTO POR SONOQUÍMICA Y CONTROL DE LA ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA"**, que presenta el **LBG. ROBERTO CARLOS CAMPOS FLORES**, como requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS**, del programa **MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL**.

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

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

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

Atentamente,

Dra. Lirio María del Tepeyac Reyna Gómez

Evaluador



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Av. Pedro de Alba S/N Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, C.P. 66455

81 8329 4000 ext. 4060 • www.fic.uanl.mx

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOH₂ EN UN BIORREACTOR
PREVIO TRATAMIENTO POR SONOQUÍMICA Y CONTROL DE LA
ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA**

Aprobación de la tesis

Dr. Arquímedes Cruz López

Dr. Santiago Iván Suárez Vázquez

Dra. Lirio María del Tepeyac Reyna Gómez

DR. GERARDO FAJARDO SAN MIGUEL

SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

RESUMEN

Debido a los múltiples problemas medioambientales que generan los combustibles fósiles, en los últimos años se han buscado nuevas fuentes de energía renovables y amigables con el medio ambiente. Es por ello que en el presente trabajo se evaluó la producción de bioH₂ como vector energético a través del proceso de fermentación oscura mediante la codigestión de dos diferentes tipos de aguas residuales de la industria alimenticia: nejayote, que es el agua residual proveniente del proceso de nixtamalizado del maíz y agua residual de rastro, utilizando como inóculo lodo granular de una planta tratadora de agua residual de la industria cervecera ubicada en la zona metropolitana de Monterrey.

El presente trabajo consistió en tres etapas experimentales; en la primera etapa se evaluó el potencial del nejayote y agua residual de rastro para producir bioH₂ en una serie de microrreactores tipo batch. En esta etapa experimental se evaluaron las relaciones C/N 20 y 30, así como dos métodos de pretratamiento del inóculo (choque térmico y radiación UV). Los microrreactores fueron montados utilizando botellas serológicas de 124 mL con un volumen de trabajo de 90 mL, una temperatura controlada de 28°C ± 2, una velocidad de agitación de 90 RPM y un pH inicial de 5.50 ± 0.05. La segunda etapa experimental consistió en replicar las condiciones en cuanto a relación C/N del medio de los microrreactores con mejor producción de bioH₂ y escalarlo a un sistema batch de 3 L. En esta etapa experimental se montaron un total de 3 biorreactores batch con un volumen de trabajo de 3 L (RBL1, RBL2 y RBL3), el objetivo principal de esta etapa fue discernir el impacto que tiene el medio RCM en la producción de bioH₂, así como el método de pretratamiento del inóculo en un sistema de 3 L. Por último, en la tercera y última etapa experimental se montaron 2 biorreactores continuos (RC1 y RC2) con el objetivo de lograr la constante producción de bioH₂, estos biorreactores se operaron a un TRH de 6 horas, teniendo como objetivo evaluar el efecto del modo de operación y la agitación del medio en la producción de bioH₂.

La caracterización fisicoquímica tanto de los sustratos individuales como de las alícuotas tomadas a lo largo de la fermentación en las tres etapas experimentales consistió en la determinación de pH, carbohidratos totales, demanda química de oxígeno, nitrógeno total, sólidos totales, sólidos totales volátiles y azúcares reductores, además del análisis por

cromatografía de gases para cuantificar la cantidad de bioH₂ producido y ácidos grasos volátiles.

Los resultados obtenidos en la primera etapa experimental mostraron que la relación C/N 30 aunado con el pretratamiento por CT al inóculo resultan favorecedores para la producción de bioH₂, pues cuando estas condiciones fueron empleadas, se obtuvo la mejor producción de bioH₂ a nivel microrreactor con 7 mL de bioH₂ acumulado y un rendimiento de 3.56 mLH₂/gSTV. En cuanto a la remoción de materia orgánica, en los microrreactores operados bajo estas condiciones mostraron una remoción de carbohidratos totales de 35% al final de la reacción (48 h) y una remoción de 60% de DQO. A partir de los resultados anteriores obtenidos en el proceso de fermentación oscura en los grupos de microrreactores, se realizó el ajuste de los datos experimentales con el modelo de Gompertz modificado, el cual indicó que la máxima acumulación de bioH₂ (H_{\max}) = 8.83 mL H₂, con una velocidad máxima de reacción de 13.61 mLH₂/L h, un tiempo de adaptación de 11.88 h y una r^2 de 0.942 para la relación C/N 30 con CT. En la segunda etapa experimental se observó que el medio RCM solo tiene un impacto positivo en la producción de bioH₂ en las primeras 24 horas de la fermentación oscura, ya que el biorreactor que mejor acumulación de bioH₂ obtuvo fue el RBL2 con un total de 450 mL de bioH₂ a las 72 h de reacción, este biorreactor no fue suministrado con RCM. Por último, en la tercera etapa experimental se vio un impacto positivo al duplicar la agitación del medio (de 40 a 80 RPM), pues cuando estas características se pusieron a prueba en el RC2, el volumen de bioH₂ acumulado fue aproximadamente 500 mL mayor, con un acumulado total de 2,314 mL después de 18 ciclos. Así mismo, se observó una mejora tanto de producción de bioH₂ como de consumo de materia orgánica cuando el sistema se operó de manera continua, en contraste con el modo de operación batch.

El análisis de los microbiomas de los diferentes biorreactores a diferentes tiempos mostró una gran predominancia de microorganismos del género *Clostridium*, con una presencia que osciló del 21 al 87%, siendo *Clostridium butyricum* la especie atribuida a la mejor producción de bioH₂ en todos los casos. Sin embargo, también se detectó la presencia de otras especies de *Clostridium* productoras de bioH₂ como *C. beijerinckii* y *C. oryzae* encontrando una correlación en la eficiente producción del gas deseado cuando estas tres especies de

Clostridium presentaron un mayor porcentaje en el sistema. Lo anterior, también se vio reflejado en la generación de subproductos, pues en todos los casos el ácido acético fue el AGV predominante, indicando una fermentación tipo acetato en el sistema, fermentación ampliamente reportada por ser la más eficiente para la producción de bioH₂. Aunado a lo anterior, en los sistemas continuos se obtuvieron concentraciones ligeramente más altas de ácido propiónico en contraste con los sistemas batch (~6 vs ~3 mmol), lo que repercutió en el porcentaje de bioH₂ en biogás obtenido en el RC1 y RC2, sin embargo, al ser operados de manera continua, fue posible una mayor acumulación de biogás y, por consiguiente, una mayor acumulación de bioH₂ en estos sistemas. El ácido butírico fue detectado en bajas concentraciones en ambos modos de operación, alcanzando un máximo de tan solo 1 mmol en los sistemas batch y 0.5 mmol en los continuos. Por último, se detectó ácido fórmico en ambos modos de operación (6-13 mmol), encontrando una correlación con bacterias anaerobias facultativas como aquellas del orden *Lactobacillales*, ya que cuando la concentración de dicho subproducto se incrementó, se detectó un mayor porcentaje de estos microorganismos en los sistemas.

DEDICATORIA

*A mi familia, quienes lo son todo en mi vida. Especialmente a mis padres, **Carlos Campos** y **Lorena Flores**, por siempre brindarme su apoyo incondicional. Todo es por y para ustedes, muchas gracias por siempre estar para mí.*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante todo el periodo de la maestría (No. CVU: 1080269).

A los proyectos 249908 CONACYT-SENER-Sustentabilidad Energética y 485-IT2022 PAICYT UANL por la infraestructura y el financiamiento otorgado para el desarrollo del trabajo.

Al Dr. Arquímedes Cruz López, por aceptar dirigir mi proyecto de tesis. Muchas gracias por compartir sus conocimientos conmigo, por su paciencia y por contribuir en mi desarrollo profesional.

A la Facultad de Ingeniería Civil de la Universidad Autónoma de Nuevo León por permitir el uso de las instalaciones del departamento de Ingeniería Ambiental a lo largo del proyecto.

A la Dra. Lirio Reyna Gómez, por su asesoría durante todo el proyecto, agradezco enormemente todos sus consejos y por compartir su conocimientos para sacar adelante el proyecto.

Al Dr. Santiago Suarez Vázquez, por codirigir el presente trabajo y por brindarme su apoyo en la elaboración del proyecto.

A mis amigos y compañeros de la maestría, quienes hicieron muy amena mi estancia en el posgrado: M.C. Alejandra Mina, M.C. Reynaldo Reyes, ING. Javier Ramírez, M.I. Regina Martínez, M.C Edwin Fariz. Muchas gracias por su amistad y por brindarme su ayuda en el laboratorio.

A mi familia, quienes me apoyaron en todo momento. Agradezco infinitamente su apoyo en esta y en todas las etapas de mi vida tanto personal como académica, nada de esto sería posible sin su gran apoyo.

A mi novia Bárbara Escamilla. Agradezco enormemente su apoyo, por aguantarme en las malas y en las peores, por su enorme paciencia, por ayudarme a estudiar en todas mis exposiciones y por acompañarme en mi camino.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

| | |
|------------------------------------|----------|
| Introducción | 2 |
| 1.1. Justificación | 6 |
| 1.2. Hipótesis | 8 |
| 1.3. Objetivos | 8 |
| 1.3.1. Objetivo general | 8 |
| 1.3.2. Objetivos específicos | 8 |

CAPÍTULO 2

| | |
|---|-----------|
| Antecedentes y marco teórico | 10 |
| 2.1. Energía: Situación actual y perspectivas | 10 |
| 2.2. Energía a partir de biomasa | 12 |
| 2.3. Hidrógeno como fuente de energía | 14 |
| 2.3.1. Métodos de producción de hidrógeno | 16 |
| 2.4. Producción de hidrógeno vía fermentación oscura | 18 |
| 2.5. Retos en la producción de hidrógeno vía fermentación oscura | 19 |
| 2.6. Factores de importancia en la producción de hidrógeno vía fermentación oscura | 20 |
| 2.7. Microorganismos involucrados en la producción de hidrógeno vía fermentación oscura | 25 |
| 2.7.1. Factores que favorecen el crecimiento de bacterias productoras de hidrógeno . | 28 |
| 2.7.2. Mecanismos moleculares involucrados en la producción de hidrógeno | 29 |
| 2.8. Agua residual como sustrato en la producción de hidrógeno | 31 |
| 2.9. Codigestiones reportadas en la producción de bioH ₂ | 32 |

CAPÍTULO 3

| | |
|--|-----------|
| Materiales y métodos | 35 |
| 3.1. Diagrama experimental | 35 |
| 3.2. Sustratos | 36 |
| 3.3. Preparación y caracterización de la codigestión | 36 |
| 3.4. Inóculo | 37 |
| 3.5. Operación de biorreactores para la codigestión NEJ-ARR | 37 |
| 3.5.1. Microrreactores batch | 38 |
| 3.5.1.1. Análisis cinético de la producción de bioH ₂ | 39 |
| 3.5.2. Biorreactores batch de 3 L | 40 |

| | | |
|------------------------------------|---|------------|
| 3.5.3. | Biorreactores continuos de 3L..... | 41 |
| 3.5.4. | Métodos analíticos para la caracterización de los sustratos y la evaluación del proceso de fermentación oscura..... | 43 |
| 3.6. | Análisis de BioH ₂ y AGVs..... | 49 |
| 3.6.1. | Condiciones para el análisis de gases..... | 49 |
| 3.6.2. | Condiciones para el análisis de AGVs..... | 50 |
| 3.7. | Extracción de ADN e identificación de microorganismos..... | 50 |
| CAPÍTULO 4 | | |
| Resultados y discusión..... | | 53 |
| 4.1. | Caracterización fisicoquímica de los sustratos..... | 53 |
| 4.2. | Efecto del tratamiento de sonoquímica en la concentración de azúcares reductores de la codigestión..... | 54 |
| 4.3. | Operación de los microrreactores batch..... | 55 |
| 4.3.1. | Efecto del pretratamiento del inóculo en la producción de bioH ₂ | 55 |
| 4.3.2. | Rendimiento de bioH ₂ en los microrreactores..... | 68 |
| 4.3.3. | Análisis cinético de la producción de bioH ₂ vía FO..... | 69 |
| 4.4. | Operación de biorreactores batch de 3 L..... | 70 |
| 4.4.1. | Producción de biogás y bioH ₂ | 71 |
| 4.4.2. | Monitoreo de parámetros fisicoquímicos y consumo de sustratos..... | 75 |
| 4.4.3. | Producción de ácidos grasos volátiles (AGVs)..... | 78 |
| 4.4.4. | Análisis de la diversidad microbiana de los biorreactores batch de 3L..... | 81 |
| 4.5. | Operación de biorreactores continuos de 3 L..... | 89 |
| 4.5.1. | Producción de biogás y bioH ₂ | 89 |
| 4.5.2. | Monitoreo de parámetros fisicoquímicos y consumo de sustratos..... | 94 |
| 4.5.3. | Producción de ácidos grasos volátiles (AGVs)..... | 98 |
| 4.5.4. | Análisis de la diversidad microbiana de los biorreactores continuos de 3 L.... | 100 |
| CAPÍTULO 5 | | |
| Conclusiones..... | | 109 |
| 5.1. | Recomendaciones..... | 111 |
| 5.2. | Productos obtenidos..... | 112 |
| 5.3. | Referencias bibliográficas..... | 113 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 2.1. Propiedades fisicoquímicas de tres combustibles/vectores energéticos (hidrógeno, metano y gasolina) | 15 |
| Tabla 2.2. Metodologías principales para la producción de H ₂ | 16 |
| Tabla 2.3. Ventajas y desventajas de los diferentes sistemas de biorreactores utilizados en la producción de bioH ₂ | 22 |
| Tabla 2.4. Trabajos recientes en la generación de bioH ₂ usando residuos orgánicos | 33 |
| Tabla 4.1. Caracterización fisicoquímica de los sustratos (NEJ-ARR) empleados en la codigestión | 54 |
| Tabla 4.2. Coeficientes de la ecuación de Gompertz modificada para la producción de bioH ₂ | 69 |
| Tabla 4.3. Comparativa de rendimiento y productividad en la producción de bioH ₂ en diversos estudios | 74 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 2.1. Concentración anual promedio de CO ₂ atmosférico (ppm) | 11 |
| Figura 2.2. Clasificación de biocombustibles según el tipo de biomasa | 14 |
| Figura 2.3. Ruta de producción de bioH ₂ a través de la FO | 26 |
| Figura 2.4. Producción de hidrógeno molecular a partir de piruvato | 27 |
| Figura 2.5. Rutas de fermentación para la producción de hidrógeno a partir de glucosa en condiciones anaerobias | 30 |
| Figura 3.1. Descripción general de la metodología experimental de la codigestión NEJ-ARR durante la FO empleando un consorcio microbiano | 35 |
| Figura 3.2. Grupos de microrreactores batch montados de la codigestión NEJ-ARR | 38 |
| Figura 3.3. Sistema de desplazamiento de agua a través de una bureta invertida para medir el biogás generado en los microrreactores batch durante la FO de la codigestión NEJ-ARR | 39 |
| Figura 3.4. Características y condiciones de operación de los tres biorreactores batch montados utilizando la codigestión NEJ-ARR | 40 |
| Figura 3.5. Parámetros de operación de los biorreactores continuos durante la FO de la codigestión NEJ-ARR a pH=5.0 ± 0.05, relación C/N=30, medio RCM y TRH=6 h | 41 |
| Figura 3.6. Sistema de alimentación del biorreactor continuo y bomba peristáltica externa acoplada para el efluente | 42 |
| Figura 3.7. Sistema de medición de biogás acoplado al biorreactor Biostat A | 42 |
| Figura 3.8. Procedimiento de extracción de ADN | 51 |
| Figura 4.1. Concentración en mg/L de azúcares reductores en la codigestión NEJ-ARR antes y después del tratamiento por sonoquímica (30 min, 20 kHz) | 55 |
| Figura 4.2. volumen de biogás acumulado a diferentes tiempos de reacción de las dos series de microrreactores pertenecientes al primer grupo (CT, 90 RPM, 28 ± 2°C, pH inicial 5.50 ± 0.05) | 56 |
| Figura 4.3. Cantidad de bioH ₂ acumulado a diferentes tiempos de reacción de las dos series de microrreactores pertenecientes al primer grupo (CT, 90 RPM, 28 ± 2°C, pH inicial 5.50 ± 0.05) | 57 |
| Figura 4.4. Evolución del pH a diferentes tiempos de reacción de las dos series de microrreactores pertenecientes al primer grupo (CT, 90 RPM, 28 ± 2°C, pH inicial 5.50 ± 0.05) | 59 |

| | |
|---|----|
| Figura 4.5. Consumo de CHT a diferentes tiempos de reacción de las dos series de microrreactores pertenecientes al primer grupo (CT, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05) | 60 |
| Figura 4.6. Consumo de DQO a diferentes tiempos de reacción de las dos series de microrreactores pertenecientes al primer grupo (CT, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05) | 61 |
| Figura 4.7. Concentración en mmol de AGVs a diferentes tiempos de reacción de las dos series de microrreactores pertenecientes al primer grupo (CT, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05) | 62 |
| Figura 4.8 volumen de biogás acumulado a diferentes tiempos de reacción de las dos series de microrreactores pertenecientes al segundo grupo (UV, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05) | 63 |
| Figura 4.9. Cantidad de bioH ₂ acumulado a diferentes tiempos de reacción de las dos series de microrreactores pertenecientes al segundo grupo (UV, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05) | 64 |
| Figura 4.10. Evolución del pH a diferentes tiempos de reacción de las dos series de microrreactores pertenecientes al segundo grupo (UV, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05) | 65 |
| Figura 4.11. Consumo de CHT a diferentes tiempos de reacción de las dos series de microrreactores pertenecientes al segundo grupo (UV, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05) | 66 |
| Figura 4.12. Consumo de DQO a diferentes tiempos de reacción de las dos series de microrreactores pertenecientes al segundo grupo (UV, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05) | 67 |
| Figura 4.13. Concentración en mmol de AGVs a diferentes tiempos de reacción de las dos series de microrreactores pertenecientes al segundo grupo (UV, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05) | 68 |
| Figura 4.14. Ajuste de la producción acumulativa de bioH ₂ mediante la ecuación de Gompertz modificada para los microrreactores | 70 |
| Figura 4.15. volumen de biogás acumulado a diferentes tiempos de reacción en los tres biorreactores batch (40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, pH 5.50 ± 0.05) | 71 |
| Figura 4.16. Cantidad de bioH ² acumulado a diferentes tiempos de reacción en los tres biorreactores batch (40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, pH 5.50 ± 0.05) | 72 |
| Figura 4.17. Valor de pH a diferentes tiempos de reacción en los tres biorreactores batch (40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, pH 5.50 ± 0.05) | 75 |

| | |
|---|----|
| Figura 4.18. Consumo de CHT a diferentes tiempos de reacción en los tres biorreactores batch (40 RPM, 35 ± 2°C, pH 5.50 ± 0.05) | 76 |
| Figura 4.19. Remoción de DQO a diferentes tiempos de reacción en los tres biorreactores batch (40 RPM, 35 ± 2°C, pH 5.50 ± 0.05) | 77 |
| Figura 4.20. a) Remoción de ST a diferentes tiempos de reacción en los tres biorreactores batch; b) Remoción de STV a diferentes tiempos de reacción en los tres biorreactores batch. (40 RPM, 35 ± 2°C, pH 5.50 ± 0.05) | 78 |
| Figura 4.21. Concentración en mmol de AGVs a lo largo de la FO en el RBL1. (40 RPM, 35 ± 2°C, pH 5.50 ± 0.05) | 79 |
| Figura 4.22. Concentración en mmol de AGVs a lo largo de la FO en el RBL2. (40 RPM, 35 ± 2°C, pH 5.50 ± 0.05) | 80 |
| Figura 4.23. Concentración en mmol de AGVs a lo largo de la FO en el RBL3. (40 RPM, 35 ± 2°C, pH 5.50 ± 0.05) | 81 |
| Figura 4.24. Clasificación taxonómica a nivel filo del microbioma del RBL1. A) 24 h de FO; b) 72 h de FO. (40 RPM, 35 ± 2°C, pH 5.50 ± 0.05) | 82 |
| Figura 4.25. Clasificación taxonómica a nivel especie del microbioma del RBL1. A) 24 h de FO; b) 72 h de FO. (40 RPM, 35 ± 2°C, pH 5.50 ± 0.05) | 83 |
| Figura 4.26. Clasificación taxonómica a nivel filo del microbioma del RBL2 a las 72 h de FO. (40 RPM, 35 ± 2°C, pH 5.50 ± 0.05) | 85 |
| Figura 4.27. Clasificación taxonómica a nivel especie del microbioma del RBL2 a las 72 h de FO. (40 RPM, 35 ± 2°C, pH 5.50 ± 0.05) | 86 |
| Figura 4.28. Clasificación taxonómica a nivel filo del microbioma del RBL3 a las 60 h de FO. (40 RPM, 35 ± 2°C, pH 5.50 ± 0.05) | 86 |
| Figura 4.29. Clasificación taxonómica a nivel especie del microbioma del RBL3 a las 60 h de FO. (40 RPM, 35 ± 2°C, pH 5.50 ± 0.05) | 87 |
| Figura 4.30. Volumen de biogás acumulado en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos (TRH 6 h, 35 ± 2°C, pH 5.50 ± 0.05, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT) | 89 |
| Figura 4.31. Volumen de bioH ₂ acumulado en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos (TRH 6 h, 35 ± 2°C, pH 5.50 ± 0.05, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT) | 90 |
| Figura 4.32. Rendimiento de bioH ₂ en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos (TRH 6 h, 35 ± 2°C, pH 5.50 ± 0.05, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT) | 91 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.33. OLR en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos (TRH 6 h, $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT) | 91 |
| Figura 4.34. Productividad de bioH_2 en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos (TRH 6 h, $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT) | 92 |
| Figura 4.35. Valor de pH en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos (TRH 6 h, $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT) | 94 |
| Figura 4.36. Consumo de CHT en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos (TRH 6 h, $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT) | 95 |
| Figura 4.37. Consumo de DQO en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos (TRH 6 h, $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT) | 96 |
| Figura 4.38. a) Consumo de ST en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos; b) Consumo de STV en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos (TRH 6 h, $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT) | 97 |
| Figura 4.39. Concentración en mmol de AGVs en diferentes ciclos a lo largo de la FO en el RC1. (TRH 6 h, 40 RPM, $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT) | 98 |
| Figura 4.40. Concentración en mmol de AGVs en diferentes ciclos a lo largo de la FO en el RC2. (TRH 6 h, 80 RPM, $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT) | 99 |
| Figura 4.41. Clasificación taxonómica a nivel filo del microbioma del RC1. A) ciclo 7 de la FO; b) ciclo 14 de la FO. (TRH 6 h, 40 RPM, $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT) | 101 |
| Figura 4.42. Clasificación taxonómica a nivel especie del microbioma del RC1. A) ciclo 7 de la FO; b) ciclo 14 de la FO. (TRH 6 h, 40 RPM, $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT) | 103 |
| Figura 4.43. Clasificación taxonómica a nivel filo del microbioma del RC2. A) ciclo 8 de la FO; b) ciclo 13 de la FO; c) ciclo 16 de la FO (TRH 6 h, 80 RPM, $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT)..... | 105 |
| Figura 4.44. Clasificación taxonómica a nivel especie del microbioma del RC2. A) ciclo 8 de la FO; b) ciclo 13 de la FO; c) ciclo 16 de la FO (TRH 6 h, 80 RPM, $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT) | 106 |

LISTA DE ACRÓNIMOS

| | |
|-------------------------|--|
| AGVs | Ácidos Grasos Volátiles |
| ARR | Agua Residual de Rastro |
| BioH₂ | Biohidrógeno |
| C/N | Relación Carbono/Nitrógeno |
| CH₄ | Metano |
| CHT | Carbohidratos Totales |
| CO₂ | Dióxido de Carbono |
| CT | Choque Térmico |
| DA | Digestión Anaerobia |
| DNS | Ácido 3,5 Dinitrosalicílico |
| DQO | Demanda Química de Oxígeno |
| FD | Factor de dilución |
| FID | Detector de Ionización de Flama (Por sus siglas en inglés) |
| FO | Fermentación Oscura |
| GEI | Gases de Efecto Invernadero |
| H₂ | Hidrógeno |
| LGA | Lodo Granular Anaerobio |
| NEJ | Nejayote |
| NT | Nitrógeno Total |
| pH | Potencial de Hidrógeno |
| RCM | Medio Reforzado para <i>Clostridium</i> (Por sus siglas en inglés) |
| ST | Sólidos Totales |
| STV | Sólidos Totales Volátiles |
| TCD | Detector de Conductividad Térmica (Por sus siglas en inglés) |
| TRH | Tiempo de Retención Hidráulica |

CAPÍTULO 1

Introducción

El consumo de combustibles fósiles, como carbón y productos derivados del petróleo, a lo largo de los años, ha causado un gran impacto ambiental, ya que éstos combustibles son considerados como los principales causantes de la contaminación del aire debido a la generación de gases de efecto invernadero como el dióxido de carbono (CO₂) durante su combustión. Los combustibles fósiles provienen de fuentes finitas y su consumo va en aumento, cubriendo actualmente el 86% de la demanda energética mundial; El petróleo, gas y carbón, abastecen 36%, 27% y 23% respectivamente en la demanda mundial de energía, mientras que las fuentes renovables solo representan el 14% (Abas *et al.*, 2015). En el año 2018, las emisiones relacionadas con la generación de energía alcanzaron un máximo histórico de 407 ppm de CO₂, de las cuales, un 44% fueron de la combustión del carbón, un 33% del petróleo y un 23% del gas natural (REPSOL, 2019). Sin embargo, en el año 2021 este récord fue superado, pues se alcanzaron 417 ppm de CO₂ presentes en la atmósfera (Tiseo, 2022). En 2020 se generaron 3.3 terawatts (TW) de energía solamente con combustibles fósiles, lo que representa un incremento del 32% con respecto al año 2000 (Pareek *et al.*, 2020). Por lo anterior, actualmente se tiene la necesidad de desarrollar energías limpias y renovables con el objetivo de aumentar su uso a nivel mundial y así ir alternando paulatinamente el uso de combustibles fósiles.

En los últimos años se le ha dado especial importancia al desarrollo de metodologías sostenibles en la obtención de combustibles renovables y amigables con el medio ambiente, por ejemplo, la fotocatalisis del agua para obtener hidrógeno, la elaboración de celdas de combustible microbianas para obtener energía eléctrica, etc. El hidrógeno (H₂) es uno de los principales candidatos para sustituir el uso de combustibles fósiles ya que es uno de los elementos más abundantes en el universo, es inoloro, incoloro e insípido; además, es un gas que no produce contaminación ya que, al liberar su energía, no emite CO₂, tan solo vapor de agua, por lo que su impacto ambiental es nulo (Johnston *et al.*, 2005). Aunado a esto, tiene una gran densidad energética de 120 kJ/g, incluso por encima de la gasolina, cuya densidad energética es de 48 kJ/g (Cieciura-Włoch & Borowski, 2019).

Una de las metodologías más sostenibles para obtener combustibles renovables es la generación de biocombustibles a partir de residuos industriales, agrícolas y municipales gracias a la naturaleza de sus componentes bioquímicos. Se tiene evidencia que dichos

residuos son excelentes materias primas para la producción de biocombustibles como metano, bioetanol y biohidrógeno (bioH₂).

La producción de H₂ por vías biológicas (bioH₂) es posible mediante el uso de múltiples procesos metabólicos como lo son la biofotólisis del agua mediante algas verdes, biofotólisis indirecta del agua por cianobacterias, foto fermentación o fermentación oscura (FO) (Cieciura-Włoch & Borowski, 2019). Existe un especial interés en el proceso de FO para la producción de bioH₂ debido a sus ventajas, entre las cuales se pueden destacar: Su versatilidad en cuanto al uso de sustratos, el no requerir luz, sus altas tasas de conversión y que es un proceso amigable con el medio ambiente ya que permite reutilizar residuos.

En México, la industria de los alimentos es señalada como uno de los principales sectores de consumo y contaminante del agua, ya que usa el 70% del agua disponible para consumo, requiriendo más de 15 mil litros de agua para producir 1 kg de carne de res, por ejemplo (Agua.org.mx, 2016). Desafortunadamente, el agua residual generada en el procesamiento de alimentos tiene una alta carga orgánica, y muchas veces no reciben un tratamiento previo a su descarga en cuerpos de agua, tal es el caso del agua generada en la industria del nixtamalizado del maíz (nejayote) o el agua residual de los rastros (ARR), debido a que estos sectores están muy dispersos. De esta manera, si se considera al nejayote (NEJ) como sustrato, cuya composición es alta en carbohidratos (principalmente almidón y polisacáridos de xilosa, glucosa y ácido glucurónico) con una producción de 1500-2000 m³ de agua residual por cada 600 toneladas de maíz procesado (España-Gamboa *et al.*, 2018) y al ARR, el cual contiene una baja fracción de carbohidratos, pero un alto contenido de nitrógeno y cuya producción asciende a 350,000 m³ al año (Agabo *et al.*, 2019) se pueden tener importantes beneficios de la codigestión de estos dos sustratos asociados con la concentración de carga orgánica, de nutrientes y sólidos totales aunado al óptimo contenido de humedad y capacidad buffer a través del balance de la relación Carbono/Nitrógeno (C/N) (Lirio María Reyna-Gómez *et al.*, 2019).

La carga orgánica juega un papel fundamental durante el proceso de FO debido a que los azúcares solubles son aprovechados por los microorganismos, por lo tanto, se deben considerar los aspectos bióticos como factores de importancia relacionados con la estabilidad del rendimiento del biorreactor, en el entendido que los microorganismos presentes en el

sistema juegan un rol fundamental en el desarrollo de las rutas metabólicas para la producción de H₂ de manera sostenible (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015).

Diferentes autores han asociado una eficiente producción de biohidrógeno a ciertos géneros de bacterias anaerobias como *Clostridium*, *Prevotella* y *Megasphaera* en el proceso de fermentación oscura en biorreactores anaerobios; Esto es debido a que dichos microorganismos pueden fermentar mono y disacáridos a hidrógeno y ácidos grasos (Castelló *et al.*, 2020; García-Depraect *et al.*, 2017; Tapia-Venegas *et al.*, 2015). Se ha observado que factores como pH, temperatura, relación C/N, tratamiento del inóculo y los sustratos, así como la configuración del reactor, son claves en el proceso de fermentación oscura. Autores como Reyna-Gómez *et al.*, 2019 reportaron una mayor eficiencia en la producción de biogás (2221 ± 5.8 mL/L) y una presencia de bioH₂ en biogás del 23% en un biorreactor cuya relación C/N era de 30 . Saidi *et al.*, 2018 lograron mejorar la eficiencia de un biorreactor batch para la producción de bioH₂ en presencia de *Thermotoga maritima* utilizando un sistema con una relación C/N 22. Lo anterior ha permitido conocer un poco más acerca de la producción de biohidrógeno por medio de esta técnica, sin embargo, se busca tener una mayor eficiencia en la producción de este gas ya que en este proceso, además de producir bioH₂, se produce metano, etanol y ciertos ácidos grasos debido a la presencia de bacterias metanogénicas.

Dicho lo anterior, el objetivo del presente estudio es promover el crecimiento de bacterias productoras de bioH₂ a través del uso de un medio reforzado, el pretratamiento del inóculo a través de radiación UV y choque térmico (CT), así como el empleo de sonoquímica como tratamiento físico de los sustratos para facilitar la fermentación de azúcares simples. Como inóculo se usará un consorcio microbiano procedente de una planta de tratamiento de agua de la industria cervecera ubicada en la zona metropolitana de Monterrey.

Se montarán una serie de microrreactores de 90 mL en botellas serológicas de 124 mL para someter al proceso de FO dos diferentes sustratos: Agua residual del proceso de nixtamalizado del maíz (NEJ) y ARR. Dichos sustratos serán mezclados y ajustados a una relación C/N 20 y 30 y, posteriormente, sometidos a un pretratamiento por sonoquímica a 20 kHz durante 30 minutos. Posterior a ello, se llevará a cabo la misma codigestión en un biorreactor de tanque agitado de 5 L marca Sartorius Stedim modelo Biostat A con un

volumen de trabajo de 3L empleando la relación C/N que mayor eficiencia presente a nivel microrreactor, operándolo de manera discontinua (batch) y continua.

1.1. Justificación

La demanda energética aumenta año tras año debido al constante incremento de la población a nivel mundial. Actualmente, la principal fuente de energía son los combustibles fósiles, los cuales provienen de fuentes finitas, y, por ende, se les cataloga como “energías no renovables”; además, generan grandes cantidades de CO₂ durante su combustión, impactando negativamente en la calidad del aire a nivel global (Abas *et al.*, 2015).

A lo largo de los años se han presentado diversas alternativas a los combustibles fósiles, siendo el H₂ el de mayor importancia. Este elemento, gracias a sus características, tiene una mayor capacidad energética a la de cualquier combustible fósil, además, no emite gases de efecto invernadero durante su combustión, por lo que se le puede catalogar como una fuente de energía amigable con el medio ambiente. Si bien el H₂ es el elemento más abundante de la tierra, este nunca se encuentra en estado puro, sino que siempre se encuentra en conjunto con algún otro elemento. Es por esto que se han desarrollado múltiples técnicas para la obtención de este vector energético. Sin embargo, la mayoría de estas metodologías son costosas, requieren de una gran cantidad de energía y algunas utilizan combustibles fósiles como materia prima, lo que las hace insostenibles (Łukajtis *et al.*, 2018).

Aunado a la problemática energética que la sociedad enfrenta actualmente, también es más que evidente la problemática de contaminación del agua que se vive en todo el mundo. Las aguas residuales representan uno de los factores que más contaminan los ecosistemas, poniendo en riesgo la seguridad alimentaria, el acceso a agua potable y la salud de la población (Alvarado *et al.*, 2021). Debido a lo anterior, se busca el aprovechamiento de estas aguas residuales para la obtención de bioenergía como parte del desarrollo sostenible.

La FO tiene la ventaja de utilizar sustratos considerados como desechos para la producción de bioH₂ (Lirio María Reyna-Gómez *et al.*, 2019). El uso de aguas residuales para la producción de este biogás, además de presentar una alternativa en la producción de bioenergía, también representa una vía en el tratamiento de los efluentes industriales, buscando mitigar la contaminación de mantos acuíferos generada por la descarga de aguas residuales.

En este sentido, el presente trabajo pretende contribuir a la diversificación de fuentes de energía, utilizando métodos biológicos, como la FO, para obtener bioH₂. Para ello, este

trabajo busca el aprovechamiento de la materia orgánica presente en el NEJ y ARR, dos efluentes industriales con un gran impacto ambiental gracias a sus características fisicoquímicas, a través de la FO. Para tal objetivo, se busca emplearlos como codigestión, para propiciar un balance adecuado de nutrientes en el medio. El aporte científico del trabajo radica en la codigestión NEJ-ARR, la cual no se encuentra reportada en la literatura, además del pretratamiento por sonoquímica de la codigestión, buscando hidrolizar los polisacáridos presentes y, de esta manera, coadyuvar a la fermentación de azúcares simples.

1.2. Hipótesis

El crecimiento selectivo de bacterias productoras de bioH₂ en un consorcio microbiano se verá favorecido mediante el pretratamiento por sonoquímica de los sustratos y el pretratamiento *ex situ* del inóculo, así como el suministro de un medio reforzado durante la fermentación oscura en un biorreactor de tanque agitado.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar las condiciones de operación de un biorreactor de tanque agitado para favorecer el crecimiento selectivo de especies microbianas productoras de bioH₂ (*Clostridium*, *Prevotella* y *Megasphaera*) e incrementar la producción de este gas.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Muestrear y caracterizar sustratos para la codigestión anaerobia usando dos fuentes: Nejayote y agua residual de rastro como fuentes de balance de la relación C/N.
2. Emplear métodos físicos (sonoquímica) sobre los sustratos para favorecer la fermentación de monosacáridos.
3. Diseñar, construir y poner en marcha una serie de microrreactores anaerobios (pH inicial 5.5 ± 0.05 , T $28^{\circ}\text{C} \pm 2$, relación C/N 20 y 30, 10% v/v medio RCM) inoculados con un consorcio microbiano procedente de una planta tratadora de agua residual de la industria cervecera de la zona metropolitana de Monterrey previamente tratado con radiación UV y CT.
4. Caracterizar parámetros fisicoquímicos (pH, DQO, CHT, NT, ST, y SVT) y evaluar la producción de BioH₂ y AGVs en los microrreactores.
5. Escalar el proceso en un biorreactor de 5L Biostat A (Sartorius Stedim Biotech) con un volumen de trabajo de 3L replicando las condiciones del microrreactor con mejor producción de BioH₂.
6. Identificar el crecimiento selectivo de los géneros bacterianos *Clostridium*, *Prevotella* y *Megasphaera* mediante la secuenciación de amplicones utilizando el sistema Miseq illumina.

CAPÍTULO 2

Antecedentes y marco teórico

2.1. Energía: Situación actual y perspectivas

La energía es de suma importancia en la sociedad actual, pues prácticamente todas las actividades económicas e industriales están estrechamente relacionadas con la producción, uso y transformación de ésta.

La energía se cataloga como renovable y no renovable de acuerdo con su fuente de procedencia. Actualmente, la energía no renovable procedente de fuentes naturales finitas como los combustibles fósiles (carbón, petróleo y sus derivados) son los que abastecen la mayoría de la demanda energética alrededor del mundo y, según proyecciones, los combustibles fósiles seguirán siendo la fuente de energía dominante para el año 2050 con una presencia del 79% alrededor del mundo (Brockway *et al.*, 2019; Enerdata, 2022).

El ambiente, la energía y el desarrollo sustentable están estrechamente relacionados, puesto que, como se mencionó anteriormente, los combustibles fósiles son la fuente predominante de energía. Estos combustibles emiten grandes cantidades de CO₂ a la atmósfera durante su combustión, trayendo consigo grandes problemáticas medioambientales como el calentamiento global, la contaminación del aire y el deterioro de la capa de ozono (Dinç & Akdoğan, 2019). Tal como se puede apreciar en la **figura 2.1**, es más que evidente el incremento de emisiones de CO₂ a la atmósfera a lo largo de los años, debido en gran parte al consumo de combustibles fósiles alrededor del mundo (Friedlingstein *et al.*, 2019).

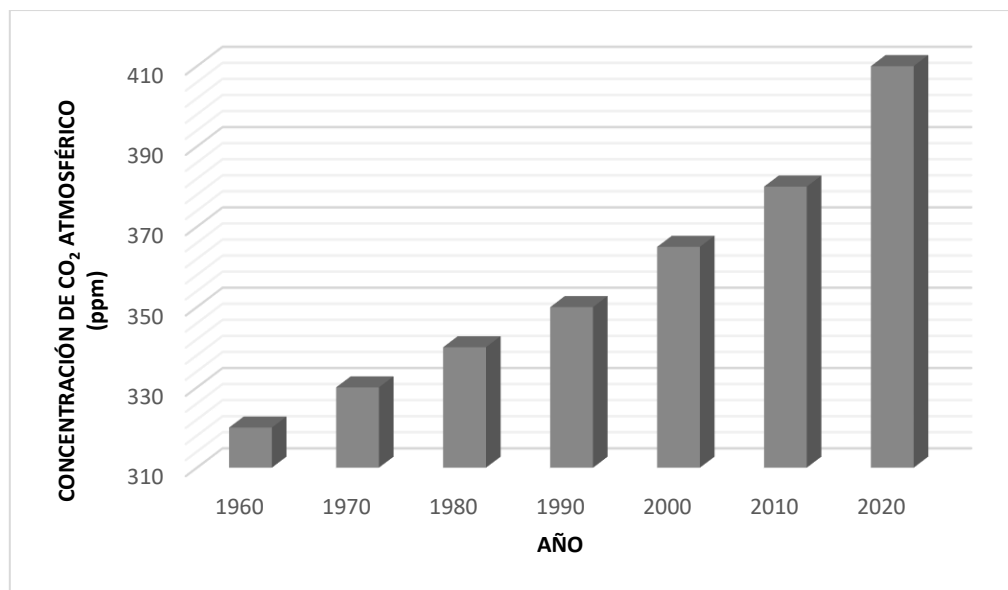


Figura 2.1. Concentración anual promedio de CO₂ atmosférico (ppm). Adaptado de Friedlingstein *et al.*, 2019.

La transición de combustibles fósiles a energías limpias amigables con el medio ambiente tendrá un papel fundamental en cuanto a la reducción las emisiones de CO₂ relacionadas a la energía, ya que dichas emisiones representan dos terceras partes de todos los gases de efecto invernadero producidos alrededor del mundo (Gielen *et al.*, 2019). En el año 2017, un cuarto de toda la electricidad alrededor del mundo fue producida utilizando energías renovables, sin embargo, la transición energética no es lo suficientemente rápida, ya que después de tres años de emisiones constantes de CO₂ relacionadas con la energía de 2014 a 2016, aumentaron en un 1.4% en 2017 y alcanzaron un máximo histórico en el año 2021 llegando a producir un total de 417 ppm de CO₂ atmosférico (Gielen *et al.*, 2019; IEA, 2017; IRENA, 2020; REPSOL, 2019).

Para que la transición energética sea llevada a cabo se requiere fortalecer el campo de investigación de las energías alternas, el buscar nuevas fuentes de energía renovable y mejorar las ya existentes con el objetivo de igualar o superar a los combustibles fósiles en términos de eficiencia energética.

2.2. Energía a partir de biomasa

Existen diversas fuentes de energía alternas en la actualidad que ayudan a suplir la demanda energética. Estas energías alternas tienen en común la sustentabilidad, es decir, cumplen con el suministro de energía en el presente sin comprometer los recursos energéticos de las futuras generaciones (Shervinzakeri & Taghizadeh, 2014). Además, son energías limpias, ya que la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) es mínima o nula.

Las energías alternas más conocidas son la energía solar, hidroeléctrica, eólica, geotérmica y los bioenergéticos. Cada una de estas fuentes generan energía a partir de los rayos solares, fuerza hidráulica, el viento, mediante el aprovechamiento del calor del subsuelo y mediante la utilización de biomasa, respectivamente (SENER, 2012). Ésta última es considerada la fuente de energía renovable con el más alto potencial de contribuir con las necesidades energéticas de la sociedad moderna (Popp *et al.*, 2021). La biomasa consiste de residuos vegetales, madera, cultivos, desechos sólidos, aguas residuales municipales y residuos del procesamiento de alimentos (Zafar *et al.*, 2021). Estos diferentes tipos de biomasa pueden ser convertidos a biodiesel, biogás (CH_4 y bioH_2), electricidad, calor e hidrocarburos utilizando diferentes tecnologías como la gasificación, pirólisis, digestión anaerobia, hidrólisis, fermentación, etc. (Kamran, 2021).

La energía obtenida a partir de la biomasa es también conocida como bioenergía. El término biomasa hace referencia al material orgánico no fosilizado proveniente de organismos vivos o que estuvieron vivos recientemente, como plantas y/o animales. Como se menciona con anterioridad, a partir de la biomasa se puede obtener diversos biocombustibles. Los biocombustibles son aquellos combustibles líquidos que son producido a través de procesos bioquímicos y térmicos, partiendo de plantas, animales y otros organismos como materia prima. Por otro lado, el biogás como biocombustible se produce por la digestión anaerobia del material biológico y es usado para producir electricidad y calor. Este biogás está compuesto principalmente por CH_4 , CO_2 , y, en menor proporción, H_2 , H_2S y NH_4^+ (Pérez-Denicia *et al.*, 2017).

Los biocombustibles se clasifican en tres generaciones según el tipo de biomasa que es utilizada para su producción (**Figura 2.2**). En la primera generación de biocombustibles la biomasa es compuesta principalmente por almidón (incluyendo azúcar) y algunos

triglicéridos obtenidos de fuentes comestibles. La biomasa de estos combustibles proviene tanto de fuentes vegetales como animales, sin embargo, el uso de fuentes comestibles como biomasa para la producción de biocombustibles tiene la desventaja de impactar en el costo de los alimentos utilizados como materia prima (ej., maíz) (Bardhan *et al.*, 2015; Srinivasan, 2009). La segunda generación de biocombustibles es una gran alternativa a los de primera generación, ya que como biomasa se utiliza principalmente material lignocelulósico, el cual no es comestible, es muy abundante, es de bajo costo y usualmente proviene de sustratos clasificados como residuos (Mata *et al.*, 2010). En esta categoría se encuentran las aguas residuales de la industria alimenticia, por ejemplo. Entre ellas podemos mencionar al nejayote, el agua residual del procesamiento de caña de azúcar, vinazas, agua residual de rastro, suero de queso, entre otras (Cieciura-Włoch & Borowski, 2019; Cruz-López *et al.*, 2022; García-Depraect *et al.*, 2017; Kapdan *et al.*, 2009). Sin embargo, debido a su compleja naturaleza, es habitual el uso de un pretratamiento a dichos sustratos para hidrolizar la lignocelulosa o polisacáridos que los conforman (Bardhan *et al.*, 2015; Zakzeski *et al.*, 2010). Por último, se encuentran los biocombustibles de tercera generación, los cuales utilizan algas como biomasa debido a su gran capacidad de crecer en cualquier tipo de sustrato utilizando diversas fuentes de carbono, teniendo la capacidad de convertir CO₂ a biocombustibles mediante la fotosíntesis (Zeng *et al.*, 2011), sin embargo, actualmente el costo de estos procesos son más altos que los de la obtención de biocombustibles de segunda generación (Bardhan *et al.*, 2015).

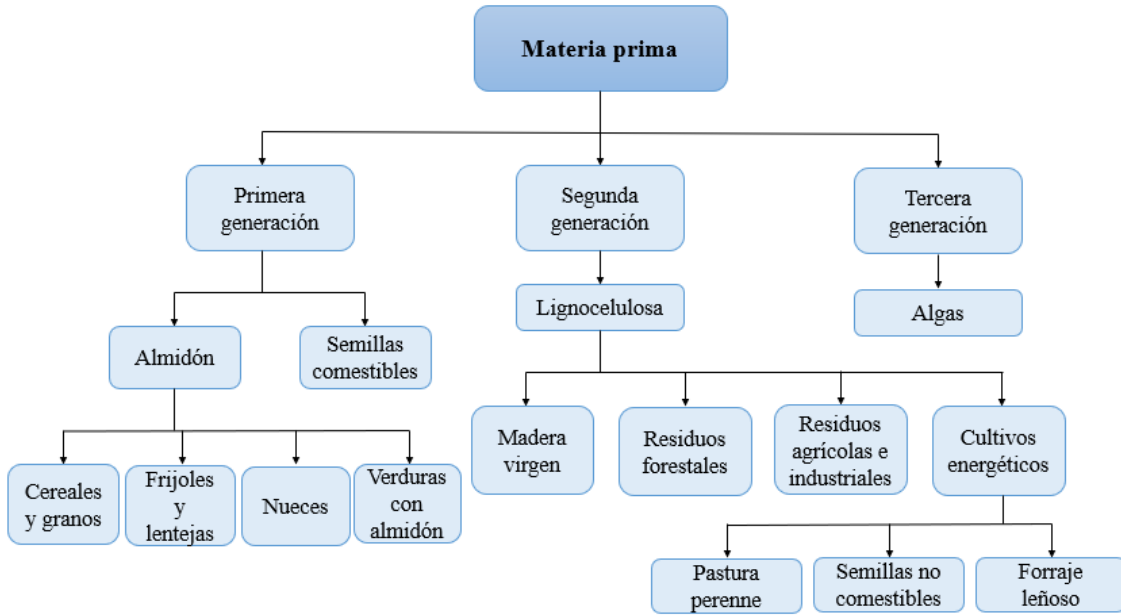


Figura 2.2. Clasificación de biocombustibles según el tipo de biomasa. Adaptado de Bardhan *et al.*, 2015.

2.3. Hidrógeno como fuente de energía

Gracias al constante y cada vez más evidente deterioro medioambiental, han habido numerosas investigaciones relacionadas con fuentes alternativas de energía. Gracias a su densidad energética 2.75 veces mayor que la de la gasolina, el H₂ es visto como una gran alternativa a los combustibles fósiles para ayudar a satisfacer la demanda energética a nivel global, pues el H₂ como vector energético no emite contaminante alguno durante su combustión (Argun & Dao, 2017; Wang & Yin, 2019).

El hidrógeno elemental ocurre libremente en la naturaleza, pero en cantidades muy pequeñas, sin embargo, es químicamente activo y puede encontrarse en muchos compuestos en combinación con otros elementos (Behera & Varma, 2016).

El gran interés por el hidrógeno como vector energético se debe a sus propiedades cruciales en cuanto a energía se refiere, pues, como se mencionó anteriormente, tiene una alta densidad energética, lo que le permitió ser empleado para propulsar cohetes y naves espaciales de la NASA en la década de los 70's (Pareek *et al.*, 2020). Además, posee una baja densidad de energía volumétrica, pues 1 kg de hidrógeno produce la energía equivalente a un galón de gasolina (3.78 L) (Ursúa *et al.*, 2012).

El H₂ reacciona con el oxígeno para producir energía y agua (**Ec. 2.1**) dando lugar a la energía del hidrógeno.



$$\Delta H = -285 \text{ kJ/mol a } 25^\circ\text{C}$$

$$\Delta G = -237 \text{ kJ/mol a } 25^\circ\text{C}$$

Un motor alimentado por hidrógeno, en contraste con un motor de combustión interna alimentado por gasolina, no propicia la emisión de óxidos de nitrógeno, esto es debido a que algunos de los óxidos de nitrógeno son formados bajo altas temperaturas de combustión (<2300 K), mientras que, la temperatura de combustión del hidrógeno es de tan solo 858 K (A. Demirbas, 2017; Balat, 2008). En la **tabla 2.1** se presenta un resumen de las características fisicoquímicas del hidrógeno, metano y gasolina.

Tabla 2.1 Propiedades fisicoquímicas de tres combustibles/vectores energéticos (hidrógeno, metano, gasolina) adaptado de Balat, 2008.

| | Hidrógeno | Metano | Gasolina |
|--|-----------|-----------|-------------------------|
| Peso molecular (g/mol) | 2.016 | 16.04 | ~110 |
| Densidad de masa (Kg/Nam³) a P=1atm T= 0°C | 0.09 | 0.72 | 720-780 |
| Punto de fusión (K) | 20.2 | 111.6 | 310-478 |
| Poder calorífico superior (MJ/Kg) | 140.0 | 55.5 | 47.3 |
| Poder calorífico inferior (MJ/Kg) | 120.0 | 50.0 | 44.0 |
| Límites de inflamabilidad (% volumen) | 4.0-75.0 | 5.3-15.0 | 1.0-7.6 |
| Límites de detonabilidad (% volumen) | 18.3-59.0 | 6.3-13.5 | 1.1-3.3 |
| Velocidad de difusión en el aire (m/s) | 2.0 | 0.51 | 0.17 |
| Velocidad de flama en el aire (cm/s) | 265-325 | 37-45 | 37-43 |
| Toxicidad | No tóxico | No tóxico | Tóxico arriba de 50 ppm |

Aunque el hidrógeno es presentado como “el combustible del futuro”, actualmente este gas se obtiene principalmente mediante el método de reformado con vapor, la cual es una tecnología bien establecida para extraer hidrógeno a partir de combustibles fósiles como materia prima, lo que repercute en el medio ambiente (Pareek *et al.*, 2020). De aquí nace la necesidad de buscar implementar nuevas metodologías a gran escala con el objetivo de obtener H₂ de una forma más limpia.

2.3.1. Métodos de producción de hidrógeno

El H₂ puede ser producido por diversas metodologías, en la **tabla 2.2** se presentan algunos de los procesos principales para la producción de este gas. Pese a ello, actualmente la mayoría del H₂ es producido casi exclusivamente a partir de combustibles fósiles, mediante procesos como el reformado con vapor de metano o la oxidación parcial de combustibles hidrocarbonados (Balat, 2008).

Tabla 2.2. Metodologías principales para la producción de H₂.

| Método | Proceso | Fundamento |
|-----------------------|-----------------------|----------------------------------|
| Termoquímico | Gasificación | Carbón |
| | Reformado de vapor | Gas natural |
| | Pirólisis | Biomasa |
| Electroquímico | Electrólisis del agua | Agua |
| | Fotoelectroquímica | Agua |
| Biológico | Biofotólisis del agua | Microalgas, cianobacterias |
| | Fotofermentación | Bacterias púrpuras no sulfurosas |
| | Fermentación oscura | Bacterias anaerobias |

Además de ser dependientes de los combustibles fósiles, muchos de los métodos actuales para la producción de H₂ requieren de grandes cantidades de energía, y requieren de altas temperaturas (Argun & Dao, 2017). Aquí los métodos biológicos toman ventaja, puesto que estos métodos requieren de mucha menos energía y tienen el potencial de utilizar residuos como sustratos. La producción biológica de hidrógeno puede ser lograda mediante diversas rutas metabólicas, como se mencionó en la tabla anterior. A continuación, se presenta el fundamento de los 3 métodos biológicos para la obtención de bioH₂:

- *Biofotólisis del agua*

Es uno de los principales procesos biológicos para la producción de H₂. Consiste en la disociación del agua hacia sus componentes moleculares (H₂ y O₂) en un sistema biológico bajo la presencia de luz. En este proceso son utilizados microorganismos fotosintéticos como algunas microalgas y cianobacterias capaces de llevar a cabo el proceso de fotosíntesis oxigénica (Anisha & John, 2014). En la biofotólisis del agua, el bioH₂ se produce mediante la absorción de luz y transferencia de electrones (Singh & Das, 2018). La principal desventaja de este proceso radica en tasas de producción muy variadas y bajas.

- *Fotofermentación*

En este proceso intervienen bacterias fotoheterótrofas que utilizan luz como fuente de energía, sin embargo, no sintetizan sus compuestos carbonados a partir de CO₂ como en el caso de las microalgas y cianobacterias involucradas en la biofotólisis. En su lugar, estas bacterias consumen moléculas orgánicas como ácido acético, ácido láctico y ácido butírico del medio y lo convierten en hidrógeno. A este tipo de bacterias se les conoce como "púrpuras no sulfurosas", los géneros de bacterias productoras de bioH₂ en este proceso que han sido más estudiados son *Rhodobacter* y *Rhodospirillum* (Martínez & García, 2010). En esta metodología la luz es necesaria para la fermentación de los compuestos orgánicos y su posterior conversión a hidrógeno.

- *Fermentación oscura*

En la FO, la producción de bioH₂ ocurre bajo condiciones anaerobias. La ruta clave de este proceso radica en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos mediante bacterias para su posterior conversión a bioH₂ y otros productos intermediarios como alcoholes y ácidos grasos volátiles (AGVs) (Akroum-Amrouche *et al.*, 2013). En este proceso, la fermentación depende del tipo y de la combinación de microorganismos utilizados, ya que la capacidad fermentativa está presente solo en algunos microorganismos. La mayoría de bacterias usan la glucosa como carbohidrato inicial para el proceso de fermentación, sin embargo, existen algunas otras que pueden degradar otros carbohidratos (Martínez & García, 2010; Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015).

En el presente trabajo se hará uso de técnicas biológicas para producción de hidrógeno, más específicamente el proceso de FO debido a su bajo costo, baja demanda energética, eficiencia y practicidad.

2.4. Producción de hidrógeno vía fermentación oscura

La FO es de gran interés debido a las múltiples ventajas que éste presenta ante el resto de los métodos biológicos para la producción de bioH₂, como lo son: no necesita de una fuente de luz, es un proceso económico y tiene la versatilidad de utilizar varios tipos de sustratos, incluyendo aquellos que pueden ser considerados como residuos (Cieciura-Włoch & Borowski, 2019). Durante la FO, los monosacáridos como la glucosa y la xilosa son la principal fuente de carbono. Sin embargo, algunos polisacáridos como el almidón y la celulosa también suplen la demanda de carbono de los microorganismos, aunque éstos últimos son más difíciles de fermentar debido a su complejidad estructural (Ntaikou *et al.*, 2010).

La reacción de biotransformación de la glucosa a ácido acético, bioH₂ y CO₂ (**Ec. 2.2**) es la ecuación aceptada como referencia para la estimación teórica de producción de hidrógeno (Argun & Kargi, 2011).



$$\Delta G^\circ = -206 \text{ KJ}$$

En la ecuación, la energía libre negativa indica que la reacción ocurre de manera espontánea y no requiere de ninguna fuente externa de energía. En teoría, se producen 4 moles de bioH₂ por cada mol de glucosa cuando el ácido acético es el único ácido graso volátil (AGV) como producto. Sin embargo, en práctica esta eficiencia disminuye debido a que parte de la glucosa es usada por los microorganismos para su crecimiento (Argun & Kargi, 2011).

Como se mencionó con anterioridad, los microorganismos involucrados en la producción de bioH₂ vía FO, tienen la capacidad de convertir una variedad de carbohidratos en hidrógeno. Esto permite el uso de diversos sustratos en el proceso. Varios autores han reportado un sinnúmero de codigestiones para la producción de bioH₂, por ejemplo; vinaza de tequila con nejayote, residuos vegetales con residuos animales, suero de queso con agua residual de cervecería, etc. (Cieciura-Włoch & Borowski, 2019; Cruz-López *et al.*, 2022; García-Depraect *et al.*,

2017; L. M. Reyna-Gómez *et al.*, 2021). En las codigestiones se emplean dos sustratos diferentes como medio de alimentación para las bacterias productoras de hidrógeno, esto se hace debido a que las codigestiones de dos residuos diferentes incrementan la producción de biogás a partir de la biomasa gracias a la optimización de la relación C/N (Qin *et al.*, 2019).

Las opciones de sustratos a emplear en las codigestiones para el proceso de fermentación oscura son variadas. Este proceso tiene la ventaja de utilizar residuos municipales, agrícolas e industriales como sustratos (Valta *et al.*, 2017). Entre los sustratos reportados en la literatura para su uso en la presente metodología están: Residuos lignocelulósicos (Cáscaras de frutas, residuos de la industria del papel, algunos residuos de la industria alimenticia, etc.), suero de queso, lodos de plantas de tratamiento de aguas, residuos de la industria cárnica, residuos de la industria del pan, entre otros (Argun & Dao, 2017; Cieciora-Włoch & Borowski, 2019; Qin *et al.*, 2019; Reyna-Gómez *et al.*, 2019; Valta *et al.*, 2017).

2.5. Retos en la producción de hidrógeno vía fermentación oscura

El proceso de FO consiste en descomponer materia prima rica en celulosa o cualquier otro polisacárido, la cual resulta en la producción de bioH₂, ácidos orgánicos y alcoholes. Si bien la producción de hidrógeno vía fermentación oscura utilizando consorcios microbianos mixtos ha demostrado ser factible, se han detectado ciertos factores que comprometen su estabilidad y eficiencia. La inestabilidad observada en este proceso es ocasionada por diversos factores como: cambios en la composición del consorcio microbiano, presencia de microorganismos consumidores de hidrógeno, la acumulación de productos durante la fermentación y la aparición de microorganismos metanogénicos que consumen los sustratos de las bacterias productoras de H₂ (Castelló *et al.*, 2020). Además, el rendimiento de hidrógeno obtenido durante la FO es 50% menos que el rendimiento teórico (Levin *et al.*, 2009). Otra de las problemáticas que enfrenta el proceso es la producción de DQO residual, la cual tiene que ser removida antes de ser descargada en los cuerpos de agua. Por último, la FO se enfrenta a un gran problema en cuanto a la composición del biogás generado durante el proceso, pues dicho biogás contiene alrededor de un 50-60% de CO₂, el cual es una cantidad considerable que debe ser removida (Azad & Rasul, 2019). A partir de lo anterior, nace la necesidad de desarrollar un sistema óptimo de producción de bioH₂ de manera continua, en el cual se obtenga un alto rendimiento de este, se produzca menos CO₂, se elimine el metano del proceso y que genere menor DQO residual, para así hacer más atractivo

este proceso y llevarlo a escala industrial. Sin embargo, para tal objetivo se deben de controlar ciertas variables descritas a continuación.

2.6. Factores de importancia en la producción de hidrógeno vía fermentación oscura

A lo largo de los años de investigación en el campo, se han detectado diversos factores clave que se deben tomar en cuenta si se quiere optimizar el proceso de producción de bioH₂ a través de la FO. Entre los factores fundamentales a considerar se encuentran los siguientes:

- *Temperatura*

La temperatura es uno de los factores más importantes en el proceso, ya que influencia las actividades fisiológicas de los microorganismos, incluyendo a producción de metabolitos (Y. Zhang & Shen, 2006). Cuando la temperatura varía, la concentración de AGVs también varía, lo cual indica un cambio en las rutas metabólicas de los microorganismos (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015). Según Chen *et al.*, 2005 la producción de hidrógeno mediante un consorcio microbiano incrementa cuando la temperatura aumenta de 33 a 39°C, y decrece cuando la temperatura sobrepasa los 41°C. La producción máxima de hidrógeno ocurre cuando el medio se encuentra en una temperatura de 35°C, pues los microorganismos utilizados para este fin suelen ser mesofílicos, teniendo una mayor proliferación cuando se trabaja a temperaturas que oscilan de 30 a 40°C (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015).

- *pH*

Otro factor de suma importancia en el proceso de la FO es el pH. Este parámetro debe ser estrictamente regulado en el proceso de codigestión anaerobia ya que no solo afecta el rendimiento de la producción de bioH₂, sino que también altera los productos generados en el proceso de fermentación y la composición de las comunidades microbianas (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015). De acuerdo con Mizuno *et al.*, 2000 la producción máxima de bioH₂ ocurre cuando el pH del medio es de 5.5 y dicha producción es totalmente inhibida cuando el pH se acidifica a valores de 4.5. En biorreactores batch o discontinuos, la máxima producción de bioH₂ (1.47 mol H₂/mol hexosa ocurre a pH 5.2, mientras que a pH 4 la producción es inhibida y a pH 6 la producción decrece considerablemente (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015).

- *Tiempo de retención hidráulico (TRH)*

El TRH es otro de los factores a tener en cuenta si se busca mejorar la producción de bioH₂. El TRH se refiere al periodo de tiempo en el cual una unidad de sustrato interactúa con los microorganismos en el biorreactor para obtener la bioconversión deseada (Banu J *et al.*, 2021). Este parámetro se ve alterado por diversos factores como la velocidad de reacción (por ejemplo; el tipo y concentración del sustrato), la concentración de células viables en la reacción, la composición del sustrato, etc. Diversos autores reportan que el TRH ideal en la FO para la hidrogenesis puede variar desde pocas horas hasta 1 día (24 H) (Lay *et al.*, 2010; Scoma *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2006), mientras que, para la metanogénesis, se requiere de varios días (Arimi *et al.*, 2015). Los tiempos de retención más largos podrían no ser recomendables para la producción de bioH₂ debido a la transición de la fase de acidogénesis a la metanogénesis. Por lo que, los en los tiempos de retención más cortos, se podría ver inhibido el crecimiento de bacterias metanogénicas (Hallenbeck & Ghosh, 2009), ya que dichas bacterias crecen de 4 a 5 veces más lento que las bacterias productoras de hidrógeno (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015).

- *Configuración del reactor*

Existe una gran variedad de biorreactores utilizados para producir hidrógeno mediante el proceso de FO, entre ellos se encuentran los reactores de tanque agitado (CSTR, por sus siglas en inglés), los reactores anaerobios de lecho fluido (AFBR, por sus siglas en inglés), los reactores anaerobios de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés) y los reactores de membrana (MBR, por sus siglas en inglés). La conversión del o los sustratos a bioH₂ mediante FO depende principalmente de la configuración del biorreactor y de las condiciones de operación. Un biorreactor eficiente, se caracteriza por tener la habilidad de funcionar a un TRH más bajo y, además de esto, debe de tener la capacidad de evitar el lavado de la biomasa causado por el bajo TRH (Banu J *et al.*, 2021). En la **tabla 2.3** se presentan las ventajas y desventajas de los biorreactores anteriormente mencionados.

Tabla 2.3. Ventajas y desventajas de los diferentes sistemas de biorreactores utilizados en la producción de bioH₂.

| Configuración del biorreactor | Ventajas | Desventajas | Referencia |
|--------------------------------------|--|--|--|
| CSTR | <ul style="list-style-type: none"> *Permite regular la agitación del medio. *Permite una mayor transferencia de masa. | <ul style="list-style-type: none"> *El lavado del inóculo ocurre frecuentemente. *Requiere de un periodo de aclimatación previo. | (Castillo-Hernández et al., 2015; Kuan Yeow Show et al., 2011) |
| AFBR | <ul style="list-style-type: none"> *Propicia la formación de biopelículas en la superficie. *Posee buena capacidad de mezcla y el estrés producido por ello es menor en contraste con los reactores CSTR. *Pueden operar con bajos TRH. | <ul style="list-style-type: none"> *Son más propensos al lavado del inóculo en contraste con los CSTR. Requiere de altas cantidades de energía. | (Z. P. Zhang et al., 2007, 2008) |
| UASB | <ul style="list-style-type: none"> *Tiene la mayor eficiencia de conversión a hidrógeno con un menor TRH. *El lavado del inóculo es mínimo. | <ul style="list-style-type: none"> *Su arranque es prolongado, pues requiere de tiempo de aclimatación. *Presenta una elevada cantidad de biomasa en el efluente. *Alta retención de sólidos. | (Banu J et al., 2021; Rajesh Banu et al., 2015) |
| MBR | <ul style="list-style-type: none"> *Disminuye considerablemente la DQO residual. | <ul style="list-style-type: none"> *El tiempo de retención de sólidos (TRS) es alto. *Producción de bioH₂ limitada. *Elevados costos de operación. | (Banu J et al., 2021; Oh et al., 2004) |

- *Relación C/N*

Toda materia orgánica es capaz de producir biogás a partir del proceso de fermentación anaerobia. Para una óptima producción de biogás, los niveles de micro y macronutrientes en el medio deben estar en abundancia, ya que el crecimiento de bacterias se inhibe cuando estos nutrientes faltan. El carbono y el nitrógeno son los principales elementos que las bacterias acetogénicas (productoras de bioH_2) y metanogénicas utilizan como fuente de alimentación. El carbono y el nitrógeno fungen como fuente de energía y como medio para la formación de nuevas células, respectivamente (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015), además, la relación C/N, es un parámetro de suma importancia que se debe considerar cuando se trabaja con codigestiones pues no solo contribuye a tener un balance de nutrientes, sino que también coadyuva a la amortiguación del pH de los sustratos, impactando de manera positiva en los procesos bioquímicos involucrados en la producción de hidrógeno (Lirio María Reyna-Gómez *et al.*, 2019). El exceso o el déficit de nutrientes en el medio puede afectar la actividad biológica y la diversidad microbiana en el biorreactor, causando variaciones en los productos de la fermentación (Oztekin *et al.*, 2008). Según Wang & Wan, 2009, la concentración de nitrógeno en el medio tiene un rol fundamental en la producción de bioH_2 a través de FO, pues el nitrógeno forma parte de proteínas, ácidos nucleicos y diversas enzimas que son encargadas del crecimiento de las bacterias productoras de hidrógeno. Una alta concentración de nitrógeno podría inhibir la producción de bioH_2 debido a que propiciaría un cambio en la estructura microbiana y, consecuentemente, un cambio en las rutas metabólicas de los microorganismos (Koskinen *et al.*, 2007; Oh *et al.*, 2003). Por otro lado, una baja concentración de nitrógeno compromete el crecimiento celular (C. Y. Lin & Lay, 2004).

Diversos autores han intentado definir una concentración de nitrógeno adecuada para el proceso de FO, sin embargo, es imposible definir una óptima relación C/N debido a las diferencias que se llegan a presentar entre las configuraciones del biorreactor, las condiciones de operación y las características fisicoquímicas de los sustratos empleados (Del Pilar Anzola-Rojas *et al.*, 2015).

Existen varias discrepancias entorno a esto, por ejemplo, según Xia *et al.*, 2016 el rango óptimo de C/N en digestiones anaerobias va de un rango de 20 a 30. Por otro lado, Lin & Lay, 2004 obtuvieron su mejor rendimiento de bioH_2 (4.8 mol H_2 /mol de sucrosa) utilizando

una relación C/N de 47, Cheong & Hansen, 2007 obtuvieron la máxima producción de bioH₂ (25 mLH₂/h g) trabajando con una relación C/N 30 en un medio termofílico utilizando agua residual de rastro como sustrato. En contraste, existen autores que reportan una mayor producción de bioH₂ a relaciones C/N altas, tal es el caso de Argun *et al.*, 2008, los cuales observaron el mejor rendimiento de bioH₂ (281 mL H₂/g de almidón) trabajando con una relación C/N de 200. Sin embargo, pese a estas grandes diferencias, la relación C/N en un rango de 20 a 40 es comúnmente utilizada como un parámetro asociado al mejoramiento de la capacidad de amortiguación de pH del sistema, y, por consiguiente, al mejoramiento en la producción de bioH₂ (Basak *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2018; Gomez-Romero *et al.*, 2014; Prapinagsorn *et al.*, 2018).

- *Inóculo*

Otro de los parámetros a considerar en el proceso de fermentación oscura para la producción de bioH₂ es el inóculo, pues de ahí provienen las bacterias generadoras de este biogás. Una cantidad apropiada de un cultivo externo como inóculo es esencial para una efectiva fermentación oscura (Ghimire *et al.*, 2016). Se ha reportado el uso de cultivos puros de *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum* y *Clostridium acetobutyricum* para la producción de bioH₂. Sin embargo, también se han utilizado consorcios microbianos provenientes de lodo anaerobio de plantas tratadoras de agua debido a la diversidad microbiológica que estos presentan, pero estos últimos tienen que ser previamente tratados por métodos de CT, radiación UV, tratamiento alcalino o ácido con el objetivo de eliminar ciertas bacterias consumidoras de hidrógeno y bacterias metanogénicas (Argun & Dao, 2017; Ghimire *et al.*, 2016). Además, el empleo de consorcios microbianos durante el proceso de codigestión anaerobia tiene como objetivo prevenir la competencia entre las comunidades microbianas nativas presentes en los sustratos y las comunidades del inóculo. Se ha visto que el uso de consorcios microbianos favorecen la proliferación de bacterias productoras de hidrógeno en el proceso de fermentación durante la fase de acidogénesis (Ahn *et al.*, 2020). Algunos de los principales géneros bacterianos productores de bioH₂ presente en los consorcios microbianos son: *Clostridium*, *Prevotella*, *Enterobacter*, *Megasphaera*, *Acetobacter*, *Bacillus*, etc. (Dzulkarnain *et al.*, 2022).

- *Sustrato*

En la actualidad, una gran cantidad de residuos orgánicos son producidos en diversas industrias, en la agricultura, e incluso en los domicilios particulares (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015). Diversos autores han aprovechado dichos residuos para la producción de bioH₂ vía FO. Se ha reportado el uso de paja de cebada, rastrojo de maíz y las mazorcas de este, así como también el bagazo de caña, y residuos de cocina (Li & Jin, 2015; Urbaniec & Bakker, 2015). Lin & Lay, 2005 estudiaron la producción de bioH₂ en un biorreactor batch usando diversos residuos orgánicos, incluyendo residuos de arroz y papa (ricos en carbohidratos), residuos de huevo y carne (ricos en proteínas) y grasa de carne incluyendo piel de pollo (ricos en grasas). En dicho estudio, concluyeron que la naturaleza química de los sustratos tiene una influencia importante en la producción de bioH₂ y en el óptimo control de pH. Un sustrato debe ser rico en carbohidratos, de fácil acceso y barato, además de provenir de fuentes sustentables, pues aquellos sustratos considerados como residuos son más atractivos debido a su bajo costo, además de que permiten ser valorizados, pues, no solo dichos residuos serían tratados, sino que, también, se les daría un segundo propósito como lo es la generación de bioH₂. Aunado a esto, los sustratos deben de requerir un nulo o mínimo pretratamiento para ser sometidos a la FO (Cieciura-Włoch & Borowski, 2019).

2.7. Microorganismos involucrados en la producción de hidrógeno vía fermentación oscura

En los últimos años se ha dado especial interés en el proceso de digestión anaerobia (DA) para la producción de energía renovable en forma de biogás o CH₄, e incluso en la producción de bioH₂, a través de la FO (Nasir *et al.*, 2012; Ntaikou *et al.*, 2010). La DA es generalmente catalogada como un proceso de cuatro fases: (1) ocurre el rompimiento de moléculas orgánicas complejas hacia sustancias simples y solubles. (2) Se forman ácidos grasos volátiles (AGVs) e hidrógeno. (3) el consumo de AGVs e hidrógeno. (4) Se produce metano a partir de los AGVs y el H₂ consumido (Wainaina *et al.*, 2019). Usualmente, para los residuos orgánicos, es necesario un método de tratamiento previo al proceso de FO (Patinvoh *et al.*, 2017). Después del pretratamiento ocurre una hidrólisis de los sustratos, en donde las bacterias acidogénicas y acetogénicas como *Butyribacterium* y *Clostridium* transforman las sustancias solubles en AGVs y bioH₂ (Wainaina *et al.*, 2019).

Durante el proceso de FO, algunas bacterias transforman las sustancias orgánicas presentes en el medio a bioH_2 y CO_2 , y los metabolitos solubles en agua como el ácido butírico, acético, propiónico y etanol. En la **figura 2.3** se observa la ruta para la obtención de bioH_2 en el proceso de FO.

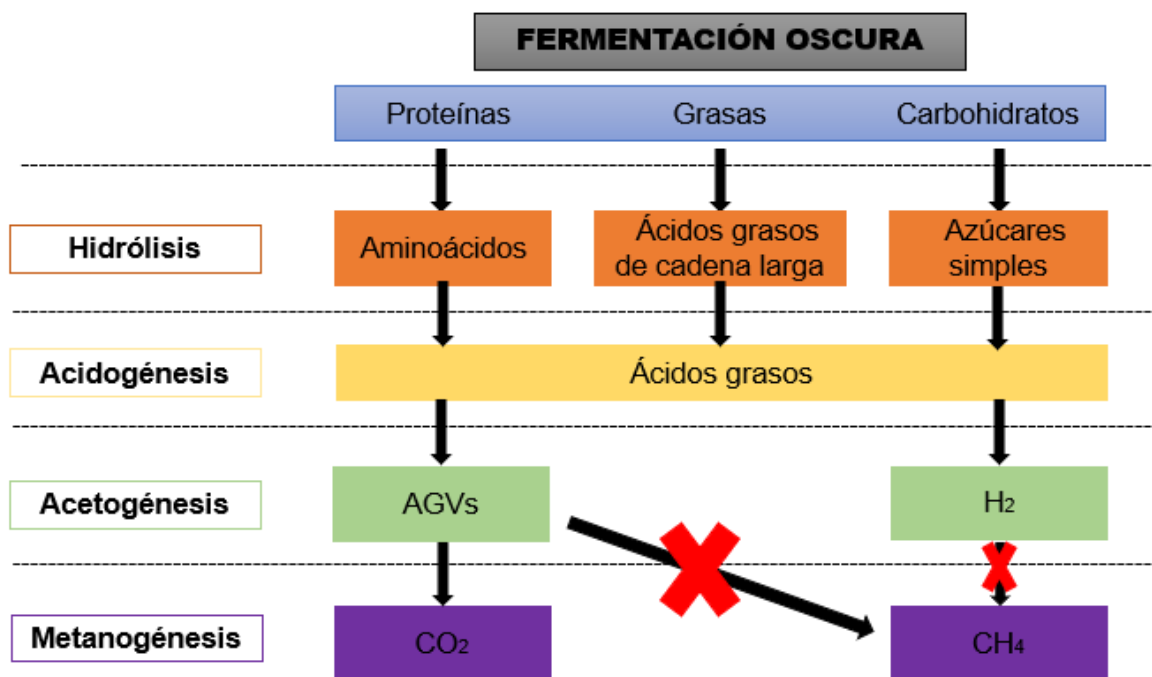


Figura 2.3. Ruta de producción de bioH_2 a través de la FO. Adaptado de Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015.

Existen ciertas diferencias entre la DA y la FO. La FO es parte de la DA, pues comprende los pasos de hidrólisis, acidogénesis y acetogénesis, omitiendo el paso de la metanogénesis. En la FO, el principal objetivo es la producción de bioH_2 , mientras que, en la AD, el principal objetivo es producir biogás rico en CH_4 . Otra de las diferencias entre estos procesos es que, en la FO se debe de inhibir el crecimiento de bacterias metanogénicas (las cuales consumen el hidrógeno), para ello, se llevan a cabo estrategias como el pretratamiento del inóculo, la operación a un TRH más bajo y a pH más bajos de 7. En la DA, se opera a un TRH mucho más alto y se opera a un pH cerca de 7. Usualmente la DA se realiza después de la FO para lograr una producción máxima de energía, además de una óptima remoción de DQO (Bharathiraja *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2016).

La producción de bioH₂ está asociada a la presencia de la proteína ferroxidina (Fd) en los microorganismos. Esta proteína funge como acarreadora de electrones con un bajo potencial redox. La transferencia de electrones de Fd a H⁺ es catalizada por enzimas hidrogenasas como se muestra en la **Figura 2.4**.

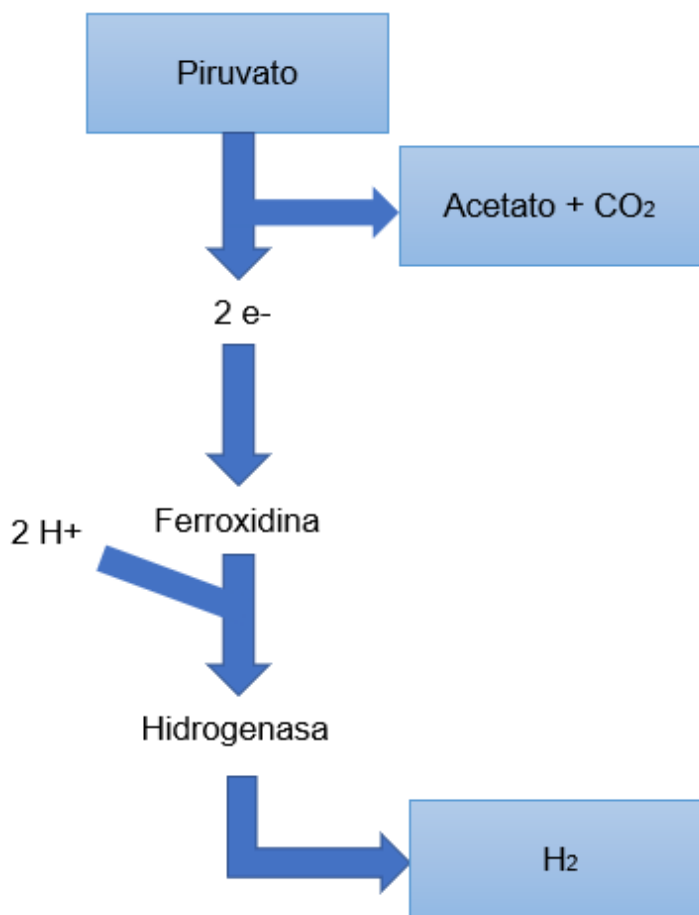


Figura 2.4. Producción de hidrógeno molecular a partir de piruvato. Adaptado de Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015.

Otras enzimas involucradas en la producción de bioH₂ son las nitrogenasas, [NiFe] hidrogenasas y [FeFe] hidrogenasas. Las nitrogenasas catalizan una reacción que fija nitrógeno a amonio y es acompañada de una obligada reducción de protones H⁺ a hidrógeno. La reducción de nitrógeno a amonio con la subsecuente producción de hidrógeno requiere de ATP. Caso contrario de las hidrogenasas, ya que éstas no requieren de ATP para producir hidrógeno (Vignais *et al.*, 2001). Las hidrogenasas consisten de una proteína que contiene un núcleo catalítico Fe-Fe y puede tener una variedad de donadores y aceptores de electrones.

Estas tres enzimas dependen del ambiente para su óptimo funcionamiento en la producción de hidrógeno, puesto que son muy sensibles al oxígeno y deben ser separadas de este elemento para lograr una producción óptima de hidrógeno, por lo que las condiciones anaerobias son óptimas para su funcionamiento (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015).

Los microorganismos anaerobios facultativos producen un máximo de 2 moles de bioH₂ por cada mol de glucosa consumido, mientras que los anaerobios estrictos producen un máximo de 4 moles de hidrógeno. Por lo que estos últimos microorganismos son más eficientes en la producción de bioH₂ (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015).

Un estudio realizado por Gomez-Romero *et al.*, 2014 reportaron bacterias del género *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Clostridium* como principales productoras de hidrógeno. Otros autores han reportado a los géneros *Prevotella*, *Megasphaera* y algunas especies del género *Bacillus* como productoras de hidrógeno (Castelló *et al.*, 2020; Patel *et al.*, 2014; Tapia-Venegas *et al.*, 2015).

Si bien el género *Clostridium*, en general, es conocido por su gran capacidad de producir hidrógeno, *Clostridium acetobutylicum* ha sido identificada como la especie con mejor eficiencia en la producción de este gas en conjunto con la producción de ácido butírico y ácido acético. Esto se debe principalmente a la habilidad que presenta de fermentar una variedad de sustratos y que en su genoma se encuentran presentes genes que codifican a ambas hidrogenasas [FeFe] y [NiFe] (*hydA*) (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015).

2.7.1. Factores que favorecen el crecimiento de bacterias productoras de hidrógeno

Como se mencionó anteriormente, existen múltiples factores que son de vital importancia en el proceso de fermentación oscura, como lo son el pH, temperatura y la relación C/N de los sustratos. Según diversos autores, los valores óptimos de pH para la producción de bioH₂ van de 5.2 a 5.7, la temperatura óptima es de 35-37°C y la relación de C/N del medio deberá ser de 20 a 40 (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015; Gomez-Romero *et al.*, 2014; Reyna-Gómez *et al.*, 2019). Estos parámetros son debido a que la mayoría de las bacterias productoras de bioH₂ (como *Clostridium*, *Megasphaera* y *Prevotella*, etc.) tienen sus condiciones óptimas de crecimiento bajo estos estándares, por lo que, un ambiente de este tipo propicia su desarrollo en el biorreactor.

Otro factor que favorece la proliferación de estas bacterias es la cantidad de nutrientes disponibles en el medio. Hussy *et al.*, 2005 detallaron la efectividad de ciertos elementos como Mg, Mn, Zn, K, I, Mn, NH₄, Ni, Ca, Cu y Mo y evaluaron como es que estos elementos actúan en el ciclo de vida bacteriano y concluyeron que los elementos más importantes para la estabilidad bacteriana fueron el magnesio, sodio, zinc y hierro.

Aunado a lo anterior, en sistemas continuos, un TRH corto favorece la producción de bioH₂, puesto que las bacterias productoras como *Clostridium* tienen la capacidad de multiplicarse más rápido que las bacterias metanogénicas. Se reportan TRH que van desde las 6 hasta las 12 horas para una óptima producción de bioH₂ (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015; Hallenbeck *et al.*, 2012).

2.7.2. Mecanismos moleculares involucrados en la producción de hidrógeno

Cada método de obtención de bioH₂ es dependiente de enzimas productoras de hidrógeno encontradas en cada microorganismo individualmente (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015). Dichas enzimas catalizan la reacción redox ilustrada en la **Ec. 2.3**.



La formación de H₂ molecular sigue generalmente dos rutas en presencia de coenzimas específicas. Por un lado se tiene la ruta de la piruvato ferroxidina oxirreductasa (PFOR) y por otro, la ruta del piruvato-formato-liasa (PFL) (Cabrol *et al.*, 2017). En ambos casos, la glucosa se convierte primero en piruvato, la cual, posteriormente, da lugar a acetil-CoA, Fd reducida o formato tal como se observa en la **Figura 2.5**.

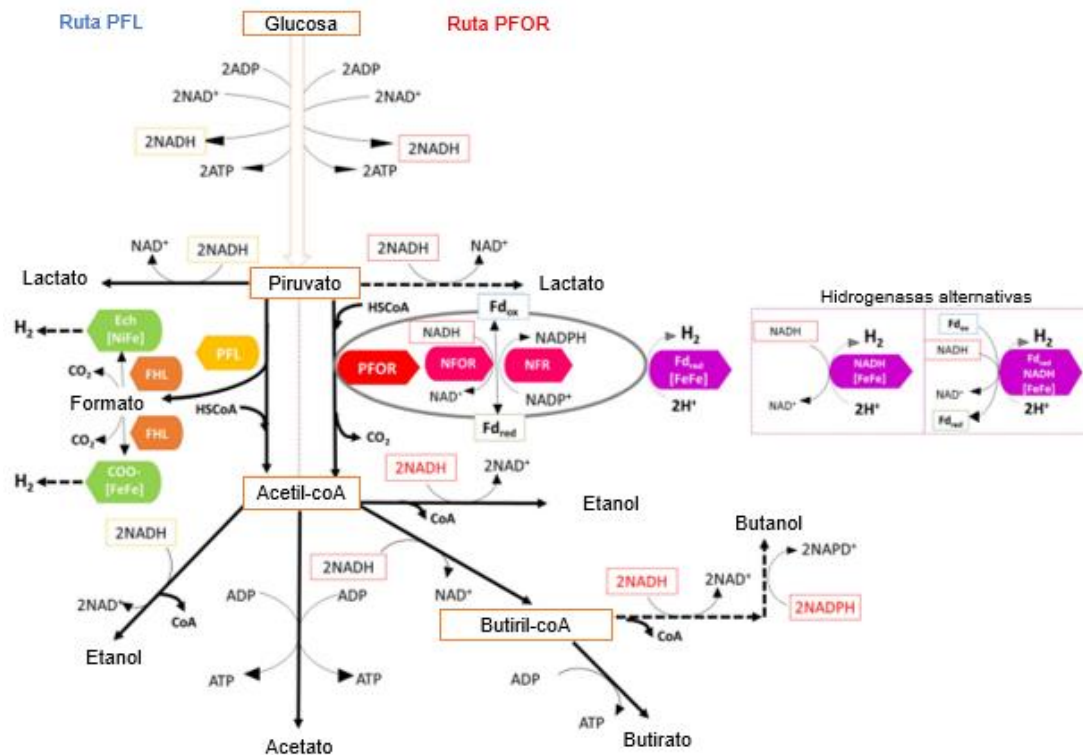


Figura 2.5. Rutas de fermentación para la producción de hidrógeno a partir de glucosa en condiciones anaerobias. El piruvato puede ser convertido a formato, a través de la ruta PFL, la cual es más común en anaerobios facultativos, o reducido a Fd y CO₂ a través de la ruta PFOR que es más común en anaerobios estrictos. Adaptado de Ramírez-Morales *et al.*, 2015.

En la ruta PFOR, la producción de bioH₂ ocurre gracias a la oxidación de la ferroxidina reducida (Fd_{red}) mediante la acción de una hidrogenasa dependiente de ferroxidina (Fd-[FeFe]). Esta ruta es principalmente usada por microorganismos anaerobios estrictos, como aquellos del género *Clostridium*, los cuales, bajo específicas condiciones, son capaces de oxidar directamente el NADH generado durante el proceso de la glicolisis para producir moléculas de hidrógeno adicionales a través de otras dos hidrogenasas; hidrogenasa dependiente de NADH (NADH-[FeFe]) y bifurcando las rutas de hidrogenasa dependiente de NADH-Fd_{red} (NADH-Fd_{red}-[FeFe]) (Tapia-Venegas *et al.*, 2015). Por ende, si se reoxida todo el NADH se podrían obtener un total de 4 moléculas de H₂ a partir de la fermentación de una molécula de glucosa. En la ruta PFL, a partir del piruvato se forma formato, el cual, a su vez, da origen a H₂ y CO₂ mediante el complejo formato-hidrógeno liasa (FHL), el cual

contiene una hidrogenasa [NiFe]. Esta ruta metabólica es usada por los microorganismos anaerobios facultativos como las bacterias del género *Enterobacteria* (Cai *et al.*, 2011). Dependiendo del microorganismo, lo anterior puede ocurrir a través de la acción de la hidrogenasa [NiFe] (hidrogenasa Ech) o de la hidrogenasa [FeFe] dependiente de formato (Tapia-Venegas *et al.*, 2015). Los anaerobios facultativos, al tener presente solamente la ruta PFL, no pueden acceder al NADH directamente para la producción de bioH₂, por ende, en teoría, están limitados a producir solo 2 moles de bioH₂ por mol de glucosa consumido (Hallenbeck *et al.*, 2012).

2.8. Agua residual como sustrato en la producción de hidrógeno

Los sustratos tienen un rol fundamental en el proceso de FO, pues intervienen directamente con la producción y el rendimiento de bioH₂. La importancia de los sustratos radica en su contenido de carbohidratos, su biodisponibilidad y su capacidad de ser biodegradados (Ghimire, 2016). Si bien se han estudiado sustratos ideales y puros como glucosa, sucrosa y mezclas de almidón teniendo resultados prometedores (J. Wang & Wan, 2009), el principal objetivo de la FO es producir bioH₂ de manera renovable y sostenible, por lo que, se requiere de sustratos considerados como residuos que provengan de fuentes accesibles, renovables y económicas (Ren *et al.*, 2011).

Diversos estudios han empleado sustratos complejos para la producción de bioH₂ mediante FO, estos sustratos son conformados por agua residual de diversos giros industriales/domésticos. Existen trabajos que han reportado producción de bioH₂ usando la fracción orgánica de residuos municipales (C. C. Chen *et al.*, 2012), agua residual proveniente de residuos de agricultura, agua residual de la industria alimenticia (como nejayote, agua residual proveniente de las almazaras y suero de queso) y efluentes de granjas y plantas tratadoras de agua (Kapdan *et al.*, 2009; K. Y. Show *et al.*, 2012).

El agua residual de ciertas industrias contienen gran cantidad de materia orgánica degradable, la cual mantiene el balance de nutrientes para la producción de bioH₂ a partir de ella (Angenent *et al.*, 2004). Sivagurunathan *et al.*, 2015 estudiaron el agua residual de la industria cervecera como sustrato en un reactor de celda inmovilizada trabajándolo a un TRH de 1.5, sus resultados arrojaron una velocidad de producción de hidrógeno (RPH) de 55 L/L-d, mayor que en sistemas alimentados con otro tipo de agua residual. Cappelletti *et al.*, 2011

realizaron un estudio utilizando agua residual de una planta de procesamiento de yuca como sustrato, inoculado con la cepa ATCC 824 de *Clostridium acetobutylicum* para la producción de bioH₂. El equipo de investigadores reportó un rendimiento máximo de 2.41 mol H₂/mol de glucosa, mostrando una buena eficiencia de esta agua residual como sustrato. Además, concluyeron que, entre más concentrado estaba el sustrato, menor era la producción de bioH₂. No solo se ha utilizado agua residual de la industria alimenticia para la producción de bioH₂, sino también de otros giros, como la industria textil. Tal es el caso del trabajo realizado por Chiu Yue Lin *et al.*, 2017 que emplearon dicho efluente para la producción de bioH₂, obteniendo como resultado un rendimiento máximo de hidrógeno de 1.52 mol H₂/mol de hexosa y un RPH de 3.9 L/L-d. El uso de agua residual como sustrato para la FO no solo es una fuente sostenible de producción de hidrógeno, sino también permite reducir el costo de tratamiento de estos efluentes, siendo una buena alternativa como materia prima para la generación de energías renovables además de ayudar a la gestión de residuos en múltiples giros industriales (Preethi *et al.*, 2019).

2.9. Codigestiones reportadas en la producción de bioH₂

Como se mencionó con anterioridad, un factor clave para la producción de bioH₂ es la disponibilidad de nutrientes en el medio, con una óptima relación C/N y capacidad de amortiguar el pH (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015). Aquí es donde las codigestiones toman un papel fundamental, pues muestran mejor eficiencia que las monodigestiones, ya que ofrecen mayor disponibilidad de nutrientes, variabilidad de sustratos y dilución de compuestos tóxicos (Lirio María Reyna-Gómez, 2021).

Las aguas residuales de las industrias han ganado campo últimamente en la producción de hidrógeno, esto debido a su abundancia, a su naturaleza contaminante y a sus características óptimas para la fermentación oscura. A continuación, en la **tabla 2.4** se presentan algunas de las principales digestiones/codigestiones empleadas en la producción de bioH₂.

Tabla 2.4 Trabajos recientes en la generación de bioH₂ usando residuos orgánicos

| Sustrato | Inóculo | Pretratamiento del inóculo | Reactor | Condiciones de operación | Referencia |
|---|------------------------------|-------------------------------------|---------|-------------------------------------|--|
| Suero de queso + residuos de frutas | Consortio microbiano | Adaptación | Batch | R 2L, T 37°C, pH 5.5, C/N = 21 | (Gomez-Romero <i>et al.</i> , 2014) |
| Vinaza+ nejayote | Consortio microbiano | Choque térmico, microaeración y luz | Batch | R 4L, T 35°C, pH 5.5, C/N = NE | (García-Depraect <i>et al.</i> , 2017) |
| Residuos vegetales + Residuos animales | Consortio microbiano | Choque térmico | Batch | R 0.70 L, T 35°C, pH 5.5, C/N = 364 | (Cieciura-Włoch & Borowski, 2019) |
| Residuos de la industria alimenticia + residuos de ganado porcino | Consortio microbiano | - | Batch | R 0.25 L, T 35°C, pH 7-8, C/N = NE | (Ahn <i>et al.</i> , 2020) |
| Agua residual de ganado vacuno | Consortio microbiano | - | Batch | R 5 L, T 45°C, pH 5.5, C/N = NE | (Tang <i>et al.</i> , 2008) |
| Agua residual de la industria cervecera | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | - | Batch | R 0.25 L, T 35°C, pH 5.5, C/N = NE | (Estevam <i>et al.</i> , 2018) |

*T=Temperatura, *R=Reactor, *NE= No especificado

CAPÍTULO 3

Materiales y métodos

3.1. Diagrama experimental

En la **figura 3.1**, se presenta un esquema general de la metodología experimental que consta de tres etapas. La primera etapa consistió en el montaje de 2 grupos de microrreactores batch con la codigestión NEJ-ARR con dos diferentes relaciones C/N (20 y 30) y como principal característica del estudio fue el pretratamiento al inóculo (CT y UV). Posteriormente, en la segunda etapa, se realizó el escalamiento a un biorreactor de tanque agitado en modalidad batch de 3 L de volumen de trabajo a partir de las mejores condiciones para la producción de bioH₂ obtenidas en los microrreactores batch. Posterior a ello, en la tercera y última etapa, se replicaron las condiciones del mejor biorreactor batch para operar el sistema en modo continuo con el objetivo de lograr la producción ininterrumpida de bioH₂ además de lograr mejores rendimientos y mayor degradación de materia orgánica.

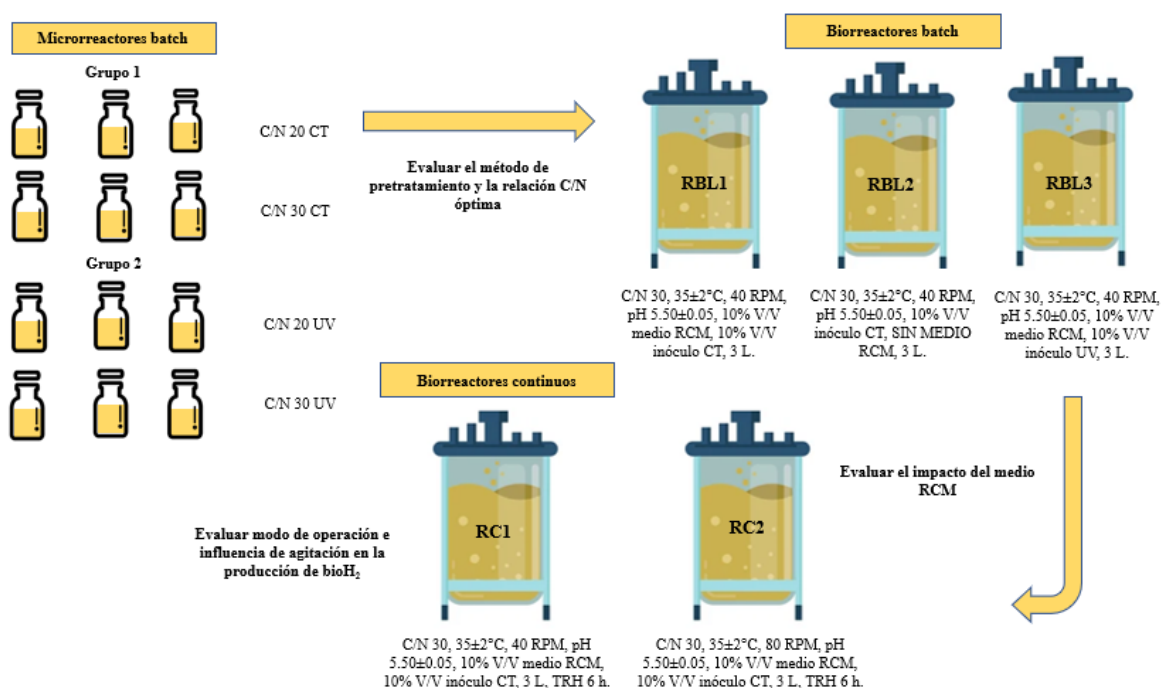


Figura 3.1. Descripción general de la metodología experimental de la codigestión NEJ-ARR durante la FO empleando un consorcio microbiano.

3.2. Sustratos

Se emplearon dos aguas residuales de la industria alimenticia como sustrato. El primer residuo corresponde al agua residual generada en el proceso de nixtamalización del maíz (NEJ) obtenida de un molino ubicado en la ciudad de Apodaca, Nuevo León. El segundo sustrato, ARR, fue preparada en el laboratorio de fisicoquímica del Instituto de Ingeniería Civil, consistió de una solución sintética emulando las características fisicoquímicas del agua generada en los rastros, para dicho objetivo, se preparó una solución 50% M/V que consistía de carne de res y agua destilada, la carne de res se dejó remojando durante dos horas en un vaso de precipitado de 2 litros, posterior a ello, fue desechada la parte sólida y se trabajó con el líquido sobrante del proceso, cuidando siempre la relación 2 a 1. La caracterización de ambos sustratos se realizó para cada muestreo semanal en el laboratorio de fisicoquímica del Instituto de Ingeniería Civil. Para la toma de muestra, se utilizaron los criterios establecidos por la PROY-NMX-AA-003/3-SCFI-2008 y se conservó la muestra en refrigeración a 4°C hasta su uso, con la intención de evitar el crecimiento de microorganismos y por, consiguiente, que las características fisicoquímicas se vieran alteradas (NMX,2008).

3.3. Preparación y caracterización de la codigestión

El proceso de FO fue llevado a cabo utilizando la codigestión de NEJ-ARR. Cada sustrato fue caracterizado individualmente y, posteriormente, fueron ajustados a las relaciones C/N anteriormente mencionadas. Una vez preparada la codigestión, fue sometida a un tratamiento de sonoquímica a 20 kHz por un periodo de 30 minutos utilizando un procesador ultrasónico marca Cole-Parmer de 750 watts, esto con el objetivo de hidrolizar los polisacáridos presentes en el nejayote (Ong & Wu, 2020). Posterior a este tratamiento, se ajustó el pH de la codigestión a 5.50 ± 0.05 y así propiciar un medio óptimo para la producción de bioH₂ (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015), para este propósito, se utilizaron los buffers NaOH 1 N y H₂SO₄ 5 N. Una vez realizada la codigestión, se tomó una alícuota para cuantificar la concentración de azúcares reductores y compararla con la concentración después de realizar el tratamiento de sonoquímica. Para tal objetivo, se empleó el método DNS reportado previamente por Alarcón, 2019.

En cuanto a la caracterización fisicoquímica de los sustratos, se determinaron individualmente los siguientes parámetros: pH, utilizando un potenciómetro Thermo Scientific modelo Orion; Carbohidratos totales (CHT), empleando el método de Dubois

(Dubois *et al.*, 1956); Demanda química de oxígeno (DQO), la cual fue llevada a cabo bajo los lineamientos de la NMX-AA-030-SCFI-2001, utilizando la metodología previamente reportada por Reyna-Gómez *et al.*, 2019. Y, por último, nitrógeno total (NT), el cual fue cuantificado utilizando el método estandarizado de Hach (kit Hach 10-150 mg/L). Para medir los azúcares reductores, CHT, DQO y NT, fue utilizado un espectrofotómetro UV-vis Perkin Elmer modelo Lambda 365. Las metodologías anteriormente mencionadas son desglosadas y explicadas en el punto 4.5.4. del presente trabajo.

3.4. Inóculo

El inóculo utilizado en este estudio consistió de lodo granular anaerobio (LGA), el cual fue obtenido de una planta tratadora de agua residual de una empresa cervecera ubicada en la ciudad de Monterrey, México, siguiendo la metodología establecida por la norma oficial mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002 (Cruz-López *et al.*, 2022; SEMARNAT, 2003). Posterior a ello, la muestra fue refrigerada a 4°C. Se tomaron dos alícuotas para pretratar el inóculo. El primer pretratamiento consistió de un choque térmico, calentando el inóculo a baño maría a 100°C durante 30 minutos, usando una plancha de calentamiento marca Thermo Scientific modelo Cimarec. El segundo método de pretratamiento fue llevado a cabo utilizando una lámpara UV de 254 nm. Para este objetivo, Se utilizó un sistema que consistía en una lámpara UV de 254 nm puesta dentro de una chaqueta de enfriamiento de cuarzo. La lámpara junto con la chaqueta de enfriamiento fueron puestas dentro de un vaso de precipitado de 1 L que contenía el inóculo a una agitación constante. Todo el sistema se montó dentro de una cámara de madera color negro con el objetivo de absorber la radiación UV. El inóculo fue irradiado con la lámpara durante 15 minutos. Ambos pretratamientos fueron llevados a cabo con el objetivo de inhibir microorganismos metanogénicos y garantizar la producción de bioH₂ (Yun *et al.*, 2015).

3.5. Operación de biorreactores para la codigestión NEJ-ARR

Como se muestra en el diagrama general de la etapa experimental en el punto 3.1, se montaron un total de 4 microrreactores batch divididos en 2 grupos. Posterior a ello, se eligió el método de pretratamiento y la relación C/N con mayor producción de bioH₂ para escalar el proceso a 3 biorreactores batch de 3 L con diferentes características; dos cuyo pretratamiento del inóculo fue CT y uno con pretratamiento UV, con el objetivo de visualizar el efecto de éste último pretratamiento a una escala mayor. La nomenclatura de estos

biorreactores batch fue RBL1, RBL2 y RBL3, cuyas características son descritas en la **figura 3.1**. Por último, se replicaron las condiciones del biorreactor batch más eficiente para la operación en modo continuo. Se montaron un total de dos biorreactores continuos (RC1 y RC2). Los parámetros de operación de cada biorreactor son detallados a continuación.

3.5.1. Microrreactores batch

Con la finalidad de evaluar la influencia que tiene el pretratamiento del inóculo en el sistema y la relación C/N del medio, se montaron una serie de 4 microrreactores batch de la codigestión NEJ-ARR en botellas serológicas de 125 mL con un volumen de trabajo de 90 mL. Los 4 microrreactores se dividieron en dos grupos descritos en la **figura 3.2**, mismos que fueron analizados a las 12, 24 y 48 h de incubación.

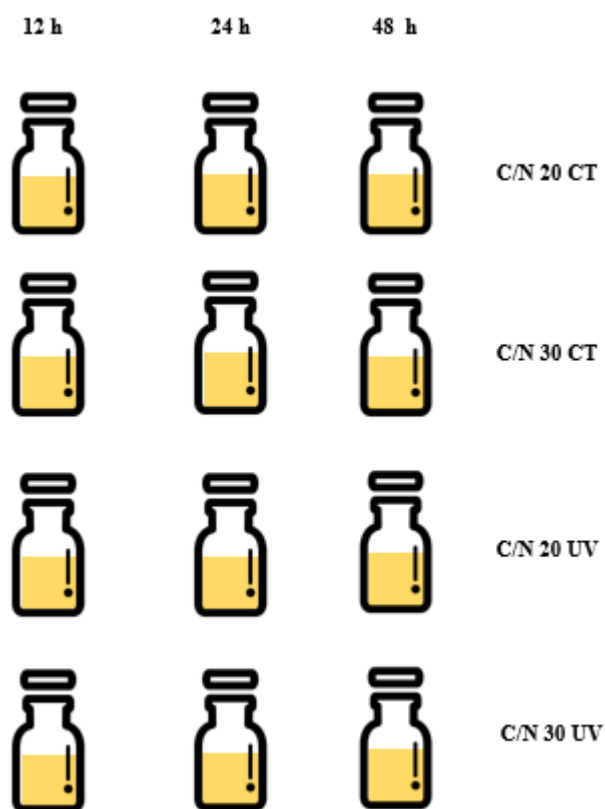


Figura 3.2. Grupos de microrreactores batch montados de la codigestión NEJ-ARR.

Cada microrreactor se identificó como: C/N 20 CT, C/N 30 CT, C/N 20 UV y C/N 30 UV, los cuales fueron operados a una agitación constante de 90 RPM, pH inicial de 5.50 ± 0.05 y temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en una incubadora marca Thermo Scientific modelo MaxQ 4000.

En cada tren de reacción se dio seguimiento a sus características fisicoquímicas como pH, consumo de DQO, CHT, ST y STV (véase sección 3.5.5), así como también se midió la cantidad de biogás generado y la composición de este en cada microrreactor a las 12, 24 y 48 horas de la reacción de FO.

El volumen de producción de biogás en los microrreactores batch se midió con el método de desplazamiento de agua utilizando una aguja de jeringa conectada a una manguera, que, en su otro extremo, fue colocado al interior de una bureta invertida y sumergida a un recipiente con agua donde se puede observar el desplazamiento del líquido debido al biogás producido como se observa en la **figura 3.3**. (Lirio María Reyna-Gómez et al., 2019).

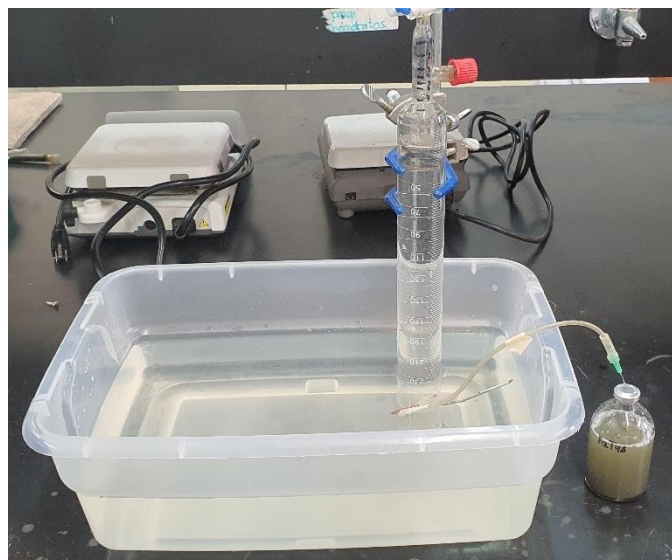


Figura 3.3. Sistema de desplazamiento de agua a través de una bureta invertida para medir el biogás generado en los microrreactores batch durante la FO de la codigestión NEJ-ARR.

3.5.1.1. Análisis cinético de la producción de bioH₂

Con el propósito de validar los resultados experimentales de la FO de la codigestión NEJ-ARR, la producción acumulativa de bioH₂ se ajustó a los microrreactores C/N 20 CT, C/N 30 CT, C/N 20 UV y C/N 30 UV con la ecuación modificada de Gompertz (**Ec. 3.1**) (Gadhe et al., 2013; Lirio María Reyna-Gómez, 2021).

$$H = H_{max} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{m,e}}{H_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad \text{Ec. 3.1}$$

Donde H representa el volumen acumulativo de bioH₂ producido (mL/L), H_{max} es el potencial de producción de bioH₂ (mL*L⁻¹), R_m es la velocidad de producción (mL*h⁻¹), λ representa la fase de latencia (h), t el tiempo de incubación (h), e la constante de Euler (2.718).

3.5.2. Biorreactores batch de 3 L

Posterior a la obtención de resultados de los microrreactores batch, se seleccionó trabajar con CT como método de pretratamiento del inóculo y con una relación C/N 30, debido a que bajo estas características se obtuvo una mayor producción de bioH₂. Se montaron un total de tres biorreactores batch de 5 L con un volumen de trabajo de 3 L. Para tal objetivo, se utilizó un biorreactor modelo Biostat A de la marca Sartorius Stedim Biotech. Las características de cada biorreactor se muestran en la **figura 3.4**.

A estos biorreactores se les asignó la nomenclatura RBL1, RBL2 y RBL3. El propósito del RBL1 y RBL2 fue de comparar a influencia que tiene el medio RCM suministrado al inicio de la FO, puesto que la única diferencia entre estos reactores fue que el RBL1 contenía 10% V/V de medio RCM y el RBL2 no. El último biorreactor batch, el RBL3, fue montado con las mismas características del RBL1, variando solamente en el método de pretratamiento del inóculo, el cual fue irradiado con luz UV, esto con el objetivo de evaluar el impacto del método de pretratamiento del inóculo en la producción de bioH₂ a un volumen de trabajo de 3 L y como segunda evaluación de dicho pretratamiento en la producción de bioH₂ vía FO.

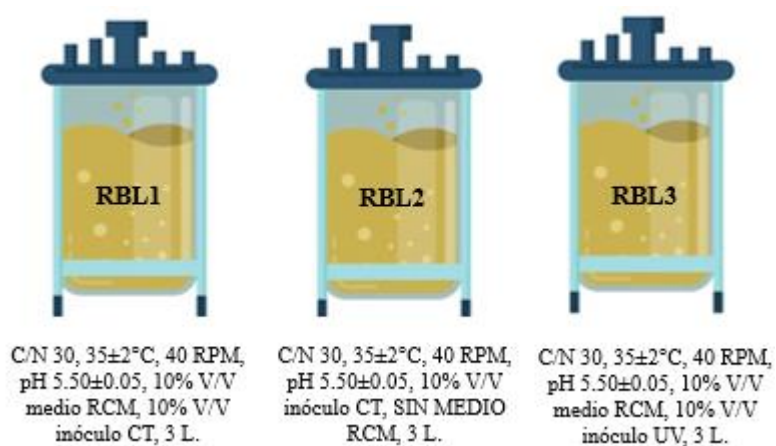


Figura 3.4. Características y condiciones de operación de los tres biorreactores batch montados utilizando la codigestión NEJ-ARR.

3.5.3. Biorreactores continuos de 3L

Con la finalidad de lograr una producción constante de bioH₂, se operó de manera continua un par de biorreactores empleando la codigestión NEJ-ARR con un TRH de 6 h. Para este propósito se eligió el método de pretratamiento CT al LGA, pues resultó ser el más efectivo en la producción de bioH₂ en los experimentos pasados, además de mantener los parámetros de pH = 5.0 ± 0.05, relación C/N=30, y 10% V/V de medio RCM. El par de biorreactores continuos (RC1 y RC2) se montaron con las características descritas en la **figura 3.5**.

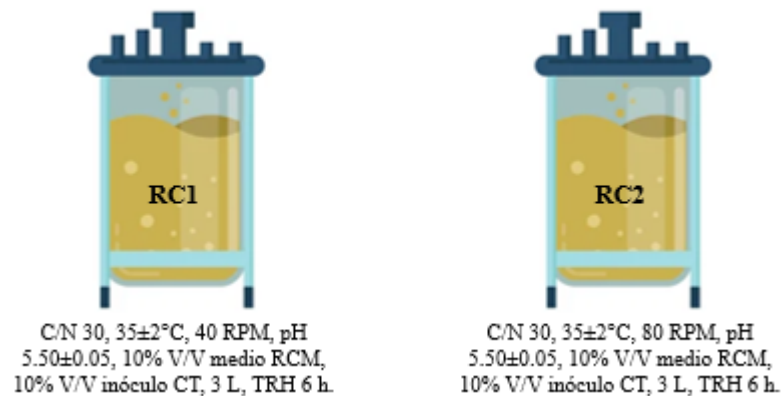


Figura 3.5. Parámetros de operación de los biorreactores continuos durante la FO de la codigestión NEJ-ARR a pH=5.0 ± 0.05, relación C/N=30, medio RCM y TRH=6 h.

Como se observa en la **figura 3.5**, la única diferencia del RC1 y el RC2 radica en la agitación, pues, el RC1 se operó a una agitación de 40 RPM, y, el RC2, se operó a una agitación de 80 RPM. Ambos biorreactores fueron operados hasta los 20 y 18 ciclos, respectivamente a un TRH de 6 horas. Para este último parámetro, se utilizó una bomba peristáltica externa acoplada al biorreactor para extraer el efluente y una bomba peristáltica interna del biorreactor para la alimentación (afluente), tal y como se observa en la **figura 3.6**.

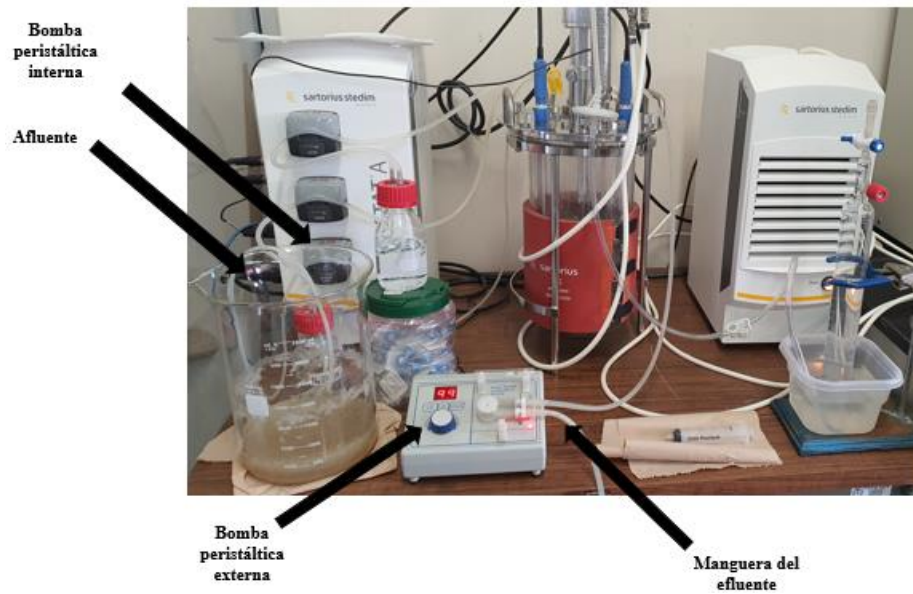


Figura 3.6. Sistema de alimentación del biorreactor continuo y bomba peristáltica externa acoplada para el efluente.

Para la medición de biogás en los biorreactores batch y continuos de 3 L, se utilizó el mismo método de los microrreactores batch como se observa en la **figura 3.7**. En este caso, se utilizó un condensador de gases equipado en el biorreactor de tanque agitado, acoplando una manguera que, en su otro extremo, estaba sumergida en el sistema de bureta invertida.

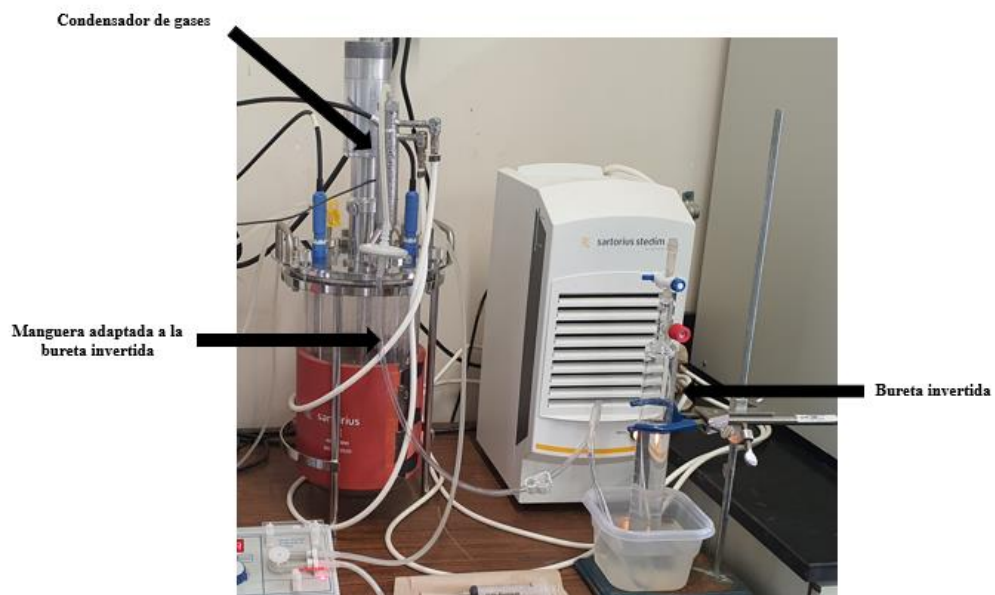


Figura 3.7. Sistema de medición de biogás acoplado al biorreactor Biostat A.

3.5.4. Métodos analíticos para la caracterización de los sustratos y la evaluación del proceso de fermentación oscura

A continuación, se describen las metodologías de las pruebas fisicoquímicas empleadas para la caracterización de los sustratos individuales, la codigestión ARR-NEJ al inicio y durante el proceso de FO.

- **Potencial de hidrógeno (pH)**

Para el análisis de pH se siguió la metodología establecida en la norma mexicana NMX-AA-008-SCFI-2016 (NMX, 2016). Para los sustratos individuales y codigestiones se tomó una muestra de 100 mL, mientras que para los microrreactores batch se tomó una muestra de 50 mL. Las muestras fueron depositadas en un vaso de precipitado de 100 mL y se midió el pH con la ayuda de un potenciómetro modelo Orión, marca Thermo Scientific. Se realizaron tres lecturas de pH *in situ* y se tomó el promedio de éstas para cada caso, cuidando que no hubiese una variación mayor a 0.03 unidades de pH entre cada una de ellas.

- **Carbohidratos totales (CHT)**

Para éste objetivo se empleó el método fenol-sulfúrico, también conocido como método de Dubois (Dubois *et al.*, 1956). Gracias a que los carbohidratos son sensibles a los ácidos fuertes y altas temperaturas, se realiza una hidrólisis ácida con H₂SO₄, rompiendo los polisacáridos en monosacáridos. Después se presentan una serie de reacciones como la deshidratación simple hasta llegar a furanos y otros compuestos coloridos. La coloración de los monosacáridos se realiza gracias a la condensación de compuestos fenólicos, por lo que el fenol interviene en el proceso.

Procedimiento:

1. Se preparó una solución de muestra diluida en agua destilada, procurando que la concentración quede en un rango de 10-100 µg/mL, que es el rango de la curva de calibración.
2. Se pasó 1 mL de la dilución previamente realizada a tubos de ensaye.
3. Se le agregó 500 µL de solución acuosa de fenol al 5% a cada tubo, para posteriormente adicionarle 3.5 mL de H₂SO₄ concentrado.
4. Se homogenizó en vórtex a máxima velocidad por 10 segundos.

5. Se dejó atemperar la muestra aproximadamente 15 minutos para posteriormente determinar la intensidad de la coloración naranja obtenida en el espectrofotómetro UV-vis modelo Lambda 365, marca Perkin Elmer a una longitud de onda de 480 nm frente a un blanco previamente preparado con agua destilada.

- **Demanda química de oxígeno (DQO)**

La DQO representa la cantidad total de materia orgánica presente en una muestra acuosa. El método de DQO es un proceso acelerado de biodegradación de materia que es usualmente realizada por microorganismos, por medio de una oxidación forzada con ciertos agentes oxidantes y métodos estándar. El método utiliza sulfato de plata (Ag_2SO_4) como catalizador en la oxidación de compuestos alifáticos lineales y sulfato de mercurio (HgSO_4) para inhibir haluros que pueden interferir con el análisis (Méndez, 2021).

La determinación de DQO, para este objetivo, se realizó de acuerdo al procedimiento establecido en la NMX-AA-030-SCFI-2001 mediante el método espectrofotométrico (NMX, 2001). Las muestras sometidas a este procedimiento, al igual que para los CHT, fueron los sustratos individuales, las codigestiones y las reacciones de FO a diferentes tiempos para el caso del modo de operación batch y para el afluente y efluente en el modo de operación continuo.

Soluciones y reactivos:

Se prepararon tres soluciones principales. La primera fue una disolución estándar de biftalato de potasio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$). Para ello, se pesó 0.851 del reactivo y, posteriormente se secó durante 2 h a 120°C . Una vez secado, se disolvió en agua y se aforó a 1 L en un matraz de aforación.

La segunda disolución preparada fue la de Ag_2SO_4 en H_2SO_4 . Para esto, se pesaron 15 g de Ag_2SO_4 y se disolvieron en 1 L de H_2SO_4 concentrado. Una vez realizada la solución, se dejó reposar durante 48 horas en un frasco ámbar para asegurar la completa disolución de los reactivos.

Por último, se preparó la solución digestora, pesando 10.216 g de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) que posteriormente se secó a 105°C durante 2 horas. Una vez seco, se añadieron

500 mL de agua destilada, 167 mL de H₂SO₄ concentrado y 33.300 g de HgSO₄ para posteriormente aforar la solución a 1 L con agua destilada.

Curva de calibración:

Para elaborar la curva de calibración, se realizaron los cálculos necesarios con la **ecuación 3.2** con la finalidad de conocer los distintos volúmenes de cada dilución a realizar. La solución patrón de C₈H₅KO₄ se preparó a una concentración de 1000 mg/L y se realizaron las diluciones correspondientes para obtener las concentraciones de 200, 400, 600, 800 y 1000 mg/L, que fue el rango de la curva de calibración.

$$C_1V_1 = C_2V_2 \qquad \text{Ec. 3.2}$$

Procedimiento:

1. Una vez realizadas las diluciones, se tomó una muestra del estándar de 2.5 mL y se colocó en su respectivo tubo de digestión con tapa.
2. En la campana de gases, se añadió a cada uno de los tubos 1.5 mL de solución digestora y 3.5 mL de la disolución Ag₂SO₄/H₂SO₄.
3. Una vez adicionada la disolución Ag₂SO₄/H₂SO₄, se taparon los tubos inmediatamente para evitar la volatilización de los compuestos orgánicos y se homogenizó la mezcla en el vórtex a máxima velocidad por 10 segundos.
4. Los tubos preparados se colocaron en el digestor marca Hach modelo DRB 200, previamente aclimatado a 150°, la reacción de digestión se configuró a 2 h.
5. Una vez pasadas las 2 h de digestión, se dejaron enfriar los tubos alrededor de 10 minutos, para posteriormente medir la absorbancia a 600 nm en el espectrofotómetro UV-vis marca Perkin Elmer modelo Lambda 365.

Cuantificación de DQO para las muestras:

Para determinar la concentración de DQO en cada una de las muestras problema (Sustratos individuales, codigestiones y biorreactores) se empleó el siguiente procedimiento:

1. Se tomaron 2.5 mL de la muestra a analizar previamente diluida a un factor de dilución (FD) que quede dentro de la curva y se colocaron en tubos para digestión
2. Se repitió el proceso de la curva de calibración a partir del punto 2.

NOTA: Para analizar la reacción de FO en los biorreactores, la alícuota tomada para su posterior análisis fue centrifugada durante 5 minutos a 3600 RPM y se trabajó con el sobrenadante con el objetivo de eliminar las interferencias que el inóculo granular podría presentar.

- **Sólidos totales (ST)**

Esta determinación fue llevada a cabo para los sustratos individuales y todos los procesos de FO (microrreactores y biorreactores CSTR en sus distintos modos de operación). Los ST fueron medidos de acuerdo a la NMX-AA-034-SCFI-2015 (NMX, 2015), siguiendo los pasos descritos a continuación.

Preparación de crisoles:

1. Se introdujeron los crisoles a la estufa (Thermo Scientific, modelo Heratherm Oven) a una temperatura de $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas.
2. Se sacaron los crisoles de la estufa y se dejaron enfriar en un desecador durante 20 minutos.
3. Se pesaron los crisoles y se introdujeron nuevamente a la estufa durante 20 minutos
4. Se repitió el ciclo desecador-estufa durante 20 minutos hasta obtener un peso constante con una diferencia no mayor a 0.0005 g en dos pesadas consecutivas.

Procesamiento de muestra:

1. Se agitó la muestra para su homogeneización.
2. Con ayuda de una probeta graduada, se tomó un volumen de 15 mL y se colocó en un crisol previamente llevado a peso constante.
3. Se llevó el crisol a secar en la estufa a una temperatura de $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas.
4. Se repitieron los pasos 2, 3 y 4 del apartado de preparación de crisoles.

Cálculos:

Terminando los análisis con muestra, se tomó en cuenta el peso del crisol vacío previamente llevado a peso constante con el peso del crisol con muestra después del procedimiento de peso constante, aplicando la **ecuación 3.3**.

$$ST = \frac{(m_3 - m_1)}{V} 1\ 000\ 000 \quad \text{Ec. 3.3}$$

Donde:

ST = Sólidos totales en mg/L.

m₃= Peso del crisol con el residuo, después de la evaporación, en g.

m₁= Masa del crisol vacío en peso constante, en g.

V= Volumen de la muestra en mL.

- **Sólidos totales volátiles (STV)**

Los STV basan su fundamento en la pérdida de peso que sufre la muestra después de ser sometida a una calcinación a 550 °C. La presente determinación, al igual que en el caso de los ST, se realizó mediante el procedimiento establecido en la NMX-AA-034-SCFI-2015 (NMX, 2015). Siguiendo estos pasos:

1. Se introdujo a la mufla (Thermo Scientific, modelo Linderbeg M) el crisol con residuo de la prueba de ST.
2. Se configuró la mufla para que suba la temperatura lentamente a 550 °C, manteniendo las condiciones durante dos horas.
3. Una vez que la mufla baje a los 100 °C, se retiró el crisol con ceniza y se introdujo a la estufa durante 20 minutos a 105 °C ± 2 °C.
4. Se realizó peso constante al crisol con ceniza hasta que la variación fuese menor a 0.0005 g en dos pesadas consecutivas.

Cálculos:

Una vez realizado el peso constante a la muestra, se procedió a realizar el cálculo de los SVT, aplicando la **ecuación 3.4**.

$$STV = \frac{(m_3 - m_4)}{V} 1\ 000\ 000 \quad \text{Ec. 3.4}$$

Donde:

STV = Sólidos totales volátiles en mg/L

m_3 = Es la masa del crisol con el residuo de ST después de la evaporación, en g.

m_4 = Es la masa del crisol con el residuo de STV después de la calcinación, en g.

V = Es el volumen de la muestra en mL.

- **Nitrógeno total (NT)**

La presente determinación fue llevada a cabo para conocer el contenido de NT de los sustratos individuales (NEJ y ARR) con la finalidad de establecer la adecuada relación C/N. Para tal objetivo, se siguió el método HACH 10072, el cual consiste en una digestión con persulfato utilizando el kit de determinación de NT de la misma marca a un rango de concentración de 10 a 150 mg/L, siguiendo los siguientes pasos:

1. Se precalentó el digestor Hach modelo DRB 200 a 105 °C
2. Se añadió el sobre con reactivo persulfato que contiene el kit al tubo de digestión, para posteriormente adicionarle 0.5 mL de muestra
3. Se taparon los tubos y se agitaron vigorosamente durante 30 segundos.
4. Una vez que el digestor alcanzó la temperatura de 105 °C, se colocaron los tubos y se dejaron por 30 minutos.
5. Una vez concluido el tiempo, se sacaron los tubos del digestor y se dejaron enfriando a temperatura ambiente durante 10 minutos.
6. Se adicionó el reactivo A del kit de NT a los tubos, se agitaron vigorosamente durante 30 segundos, dejándolos reaccionar por 3 minutos.
7. Transcurridos los 3 minutos, se les adicionó el reactivo B del kit de NT, se taparon y se agitaron vigorosamente durante 15 segundos, la solución se tornó de un color amarillento, dejándola reaccionar durante 2 minutos.
8. Del tubo de digestión con los reactivos A y B, se tomó una alícuota de 2 mL y se adicionaron a los tubos del kit de NT con el reactivo C. Se invirtieron los tubos 10 veces y se dejaron reaccionar durante 5 minutos.
9. Transcurrido el tiempo, se toma la lectura correspondiente en el espectrofotómetro UV-vis (modelo Lambda 365 marca Perkin Elmer) a una longitud de onda de 400 nm.

- **Azúcares reductores (método DNS)**

El presente método se realizó con el objetivo de determinar los azúcares reductores presentes en la codigestión antes y después del tratamiento de sonoquímica y evaluar la eficiencia de este tratamiento de hidrólisis. El método DNS (Ácido 3,5 Dinitrosalicílico) se basa en una reacción colorimétrica. El reactivo DNS es amarillo, pero al reaccionar se torna de un color pardo oscuro según la concentración de azúcares reductores de la muestra. El reactivo DNS se prepara con una solución de 100 mL con 2 g de NaOH disuelto, se agregan 2 g de DNS con agitación constante, 40 g de tartrato de sodio-potasio tetrahidratado, 0.4 g de fenol, 0.1 g de sulfito de sodio y, posteriormente se afora a 200 mL con agua destilada (Miller, 1959). El método de determinación de azúcares reductores se realizó empleando el siguiente procedimiento:

1. Se agregó 200 μ L de muestra en tubos Eppendorf de 2 mL.
2. Posterior a ello, se adicionaron 600 μ L del reactivo DNS previamente preparado.
3. Se llevaron los tubos Eppendorf a ebullición en baño María durante 5 minutos y, posterior a ello, se dejaron enfriar durante 10 minutos en un recipiente con hielo.
4. Se añadió 1200 μ L de agua destilada a los tubos Eppendorf para posteriormente homogeneizar en vórtex a máxima velocidad durante 10 segundos.
5. Se procedió a realizar la lectura de la absorbancia mediante el espectrofotómetro UV-vis (modelo Lambda 365 de marca Perkin Elmer) a una longitud de onda de 540 nm.

3.6. Análisis de BioH₂ y AGVs

El análisis de bioH₂ y ácidos grasos volátiles (AGVs) fue llevado a cabo mediante cromatografía de gases (CG). El presente análisis se realizó utilizando un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies modelo 7820 A, equipado con dos detectores; Detector de conductividad térmica (TCD, por sus siglas en inglés) y un detector de ionización de flama (FID, por sus siglas en inglés) para la identificación de bioH₂ y AGVs, respectivamente.

3.6.1. Condiciones para el análisis de gases

Se utilizó un detector de conductividad térmica para el análisis de gases. Se trabajó en conjunto con una columna Carboxen 1006 PLOT, empleando Argón como gas de acarreo. Las condiciones del cromatógrafo fueron de 40 °C en el horno, una temperatura del inyector

de 180 °C, al igual que en el analizador. Las curvas de calibración fueron realizadas utilizando estándares con mezclas de gases (H₂, CH₄, CO y CO₂) con concentraciones conocidas.

3.6.2. Condiciones para el análisis de AGVs

Los subproductos líquidos de la FO, como los son los AGVs, fueron analizados con el detector de ionización de flama, a dicho detector le fue acoplado una columna HP-INOWAX, empleando Argón como gas de acarreo. En cuanto a las condiciones cromatográficas, se trabajó con una rampa de calentamiento del horno de 70 a 180 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C por minuto, la temperatura del inyector fue de 250 °C, al igual que la temperatura del analizador. En este caso, para la realización de la curva de calibración, se empleó un estándar de Sigma Aldrich con ácidos orgánicos como: Ácido acético, Ácido propiónico, ácido butírico y ácido fórmico a diferentes concentraciones (2, 6 y 10 mmol).

Para la preparación de las muestras de AGVs de los diferentes proceso de FO llevados a cabo, se tomó una alícuota de 2 mL en tubos Eppendorf, que posteriormente fueron centrifugados a 3600 RPM durante 10 minutos utilizando una centrífuga marca Thermo Scientific modelo Sorvall ST 16/16R. Posteriormente, el sobrenadante fue filtrado utilizando una jeringa de 5 mL y acrodiscos con un tamaño de poro de 0.5 µm. Por último, el líquido filtrado fue depositado y sellado en viales para cromatografía de 2 mL y, posteriormente colocados en el muestreador de carrusel del equipo.

3.7. Extracción de ADN e identificación de microorganismos

Como parte del objetivo del presente trabajo, se determinó la composición microbiológica en ciertos tiempos y ciclos de los biorreactores en modalidad batch y continuo, respectivamente. La extracción de ácidos nucleicos fue realizada de la siguiente manera:

- RBL1: 24 y 72 h
- RBL2: 72 h
- RBL3: 60 h
- RC1: Ciclos 7 y 14
- RC2: Ciclos 8, 13 y 16

La extracción de ADN partió de 0.25 g de muestra, utilizando el kit DNeasy PowerSoil de QIAGEN, el cual consiste en propiciar una lisis celular por métodos mecánicos y químicos. Durante la lisis celular se procede a la ruptura de la pared celular bacteriana formada por lípidos y proteínas (Madigan *et al.*, 2015), permitiendo la liberación del material genético del núcleo celular. Los ácidos nucleicos se unen por adsorción en presencia de ciertas sales, el ADN genómico se captura en una membrana de sílica colocada en una membrana de centrifugado, posteriormente el ADN es lavado y finalmente se eluye de la membrana (QIAGEN, 2018). El procedimiento de extracción de ADN genómico se muestra en la **Figura 3.8**.

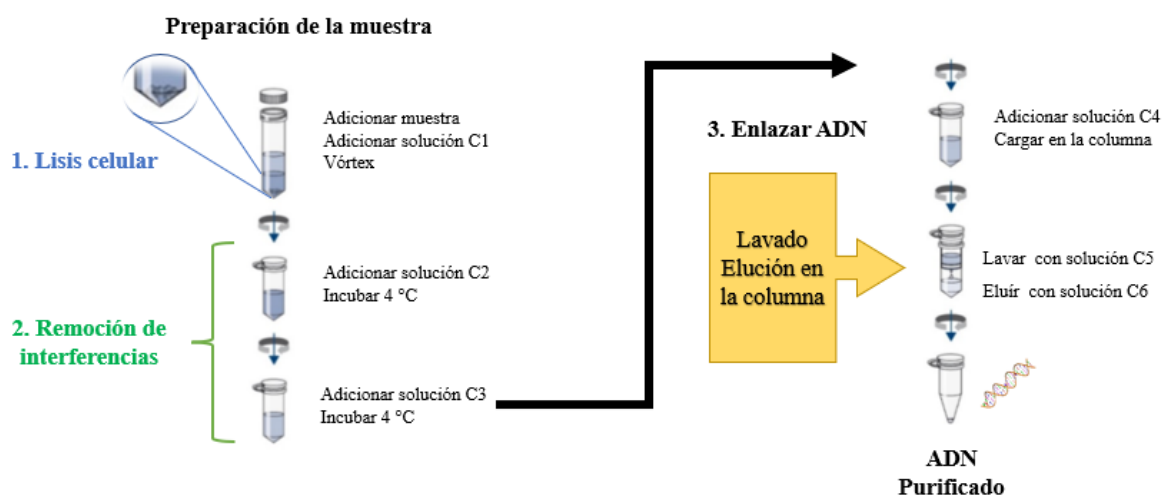


Figura 3.8. Procedimiento de extracción de ADN. Adaptado de (Lirio María Reyna-Gómez, 2021).

Una vez realizada la extracción de ADN, se procedió a realizar la secuenciación de dichas muestras para la identificación de especies microbianas presentes en las muestras anteriormente descritas. Las muestras de ADN fueron enviadas al laboratorio RTL Genomics, Texas, USA, en donde se realizó una secuenciación de amplicones, técnica avanzada de secuenciación de productos de PCR del gen 16s ARNr usando la plataforma MiSeq Illumina.

CAPÍTULO 4

Resultados y discusión

4.1. Caracterización fisicoquímica de los sustratos

En la **tabla 4.1** se presenta la caracterización fisicoquímica de los sustratos empleados. Por un lado, el NEJ presenta un pH de 10.35 ± 1.97 , una alta concentración de CHT ($17,747 \pm 1910$ mg/L) y una concentración de NT de 179 ± 80 mg/L. Por otra parte, el ARR tiene un pH de 5.69 ± 0.06 , una baja concentración de CHT (1217 ± 358 mg/L) y una concentración de NT de 2588 ± 793 mg/L. García-Depraect *et al.*, 2017 reportaron el uso de NEJ como sustrato en el proceso de fermentación oscura para la obtención de bioH₂, reportando que el NEJ tiene un pH de alrededor de 12 ± 0.2 , una concentración de CHT de $16,015.8 \pm 1649.7$ mg/L y una concentración de NT de 440 ± 21.2 mg/L lo que se asemeja a los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica en el presente trabajo. Sin embargo, el pH del NEJ es variable, porque depende de diversos factores como el molino donde es obtenido, la cantidad de cal que le es suministrada durante el proceso de nixtamalización, etc. En cuanto al ARR, Khamtib & Reungsang, 2014 reportaron características muy similares a las obtenidas, destacando variaciones considerables en el pH y los CHT, en donde obtuvieron un valor de pH de 7.12 ± 0.14 en contraste con los 5.69 ± 0.06 que se obtuvieron en este trabajo. Para el caso de los CHT, ellos obtuvieron una concentración de 440 ± 80 mg/L en contraste con los 1217 ± 358 mg/L cuantificados en esta investigación. Esto significa que el ARR utilizada en el presente trabajo presenta casi tres veces más carbohidratos que los reportados en la literatura, además, el pH del ARR utilizada en el presente se adapta más a la codigestión que se empleó, teniendo un efecto amortiguador de pH más eficiente.

La concentración de CHT y NT de ambos sustratos es idónea para generar una codigestión y someterse al proceso de fermentación oscura, sin embargo, dado al pH alcalino del nejayote es necesario el uso de soluciones amortiguadoras como H₂SO₄ 5 N para establecer el pH inicial en 5.5 ± 0.05 , rango óptimo en el cual el crecimiento de bacterias productoras de bioH₂ se ve favorecido (Mizuno *et al.*, 2000).

Tabla 4.1. Caracterización fisicoquímica de los sustratos (NEJ y ARR) empleados en la codigestión.

| Sustrato | pH | CHT mg/L | DQO mg/L | NT mg/L | ST g/L | SVT g/L |
|----------|---------|------------|----------|----------|---------|---------|
| Nejayote | 10.35 ± | 17,747 ± | 35,212 ± | 179 ± 80 | 24.21 ± | 18.13 ± |
| | 1.97 | 1910 | 2054 | | 5.24 | 4.81 |
| ARR | 5.69 ± | 1217 ± 358 | 15,969 ± | 2588 ± | 18.22 ± | 16.64 ± |
| | 0.06 | | 4936 | 793 | 0.02 | 0.01 |

4.2. Efecto del tratamiento de sonoquímica en la concentración de azúcares reductores de la codigestión

Una vez caracterizados los sustratos individuales, se mezclaron a una relación C/N 30 para posteriormente, someter la codigestión a un tratamiento por sonoquímica con el objetivo de hidrolizar los polisacáridos presentes en los sustratos y, de esta manera, facilitar la fermentación de monosacáridos y así incrementar la producción de bioH₂. Para tal motivo, se empleó un procesador ultrasónico de marca Cole-Parmer de 750 watts operado a 20 kHz durante 30 minutos. En la **figura 4.1** se muestra la concentración de azúcares reductores presentes en la codigestión NEJ-ARR antes y después del tratamiento por sonoquímica en múltiples análisis. Como se puede apreciar, la concentración de azúcares reductores se incrementó en un 58 ± 0.35% al final del tratamiento. Este resultado concuerda con lo reportado por Tao *et al.*, 2017 quienes lograron incrementar el contenido de azúcares reductores de 7.49 mg/g a 11.2 mg/g de biomasa rica en lignocelulosa, aplicando un pretratamiento de sonoquímica a 20 kHz durante 30 minutos. El tratamiento por ultrasonido de los sustratos ha demostrado favorecer la producción de bioH₂ mediante el proceso de FO. Un estudio conducido por H. Wang *et al.*, 2012 utilizando tallo de maíz (TM) como sustrato, demostró una mejora en la producción de bioH₂ de 17.03 mL/gTM h cuando se le administro un tratamiento de sonoquímica al TM. Según sus resultados, la proporción de producción de bioH₂ fue 6.1 veces mayor que cuando utilizaron TM sin sonoquímica.

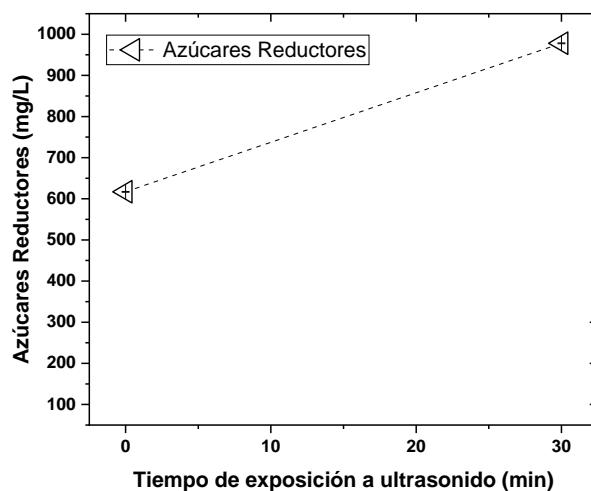


Figura 4.1. Concentración en mg/L de azúcares reductores en la codigestión NEJ-ARR antes y después del tratamiento por sonoquímica (30 min, 20 kHz).

4.3. Operación de los microrreactores batch

Después de la caracterización fisicoquímica de los sustratos, se realizó el primer experimento que consistió en la puesta en marcha de una serie de microrreactores batch de 90 mL de volumen de trabajo con el fin de evaluar el potencial de la codigestión NEJ-ARR en la producción de bioH_2 , además de evaluar el efecto del método de pretratamiento del inóculo (LGA), siguiendo la metodología presentada en la figura 3.1 del capítulo 3. Para tal objetivo, se montaron dos grupos de microrreactores; el primer grupo consistió de 2 microrreactores cuyo inóculo fue tratado con CT, uno de ellos fue montado bajo una C/N 20 y otro a C/N 30, la misma logística se le aplicó al otro grupo restante, cuyo pretratamiento al inóculo fue radiación UV.

4.3.1. Efecto del pretratamiento del inóculo en la producción de bioH_2

Para evaluar el efecto del CT y UV al inóculo, se dio seguimiento a la evolución de los dos grupos de microrreactores batch montados a lo largo de 48 horas, con tiempos de muestreo a las 12, 24 y 48 horas del proceso de FO.

- Microrreactores tratados con CT

El primer método de pretratamiento a evaluar fue el CT. En la **figura 4.2** se presentan los resultados de producción de biogás acumulado por 48 h de los microrreactores batch

conteniendo la codigestión NEJ-ARR con relaciones C/N 20 y 30. Como se puede observar en dicha figura, el volumen de biogás acumulado en la serie de microrreactores fue similar (~10 mL) en las primeras 12 h. Posteriormente, se incrementó de manera importante en el microrreactor C/N 30 CT, acumulando 78 mL a las 24 h y 88 mL a las 48 h. Por su parte, el microrreactor C/N 20 CT, en el mismo intervalo de tiempo, mantuvo una producción de biogás acumulado por debajo de los 20 mL. A partir de la descripción anterior, el microrreactor C/N 30 CT produjo 4 veces más biogás.

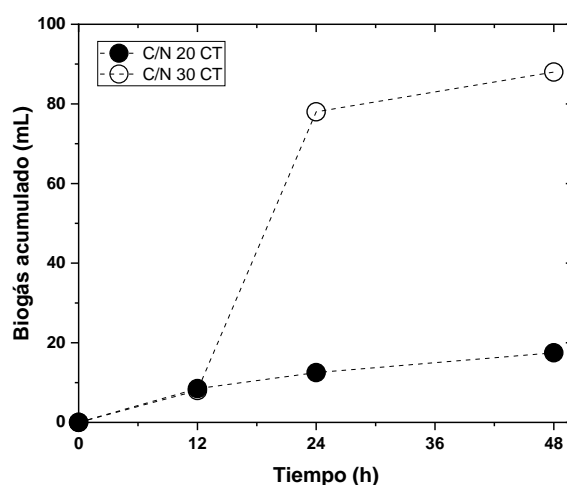


Figura 4.2. Volumen de biogás acumulado a diferentes tiempos de reacción de los microrreactores pertenecientes al primer grupo (CT, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05).

A partir del análisis cromatográfico de las muestras de biogás de este primer grupo de microrreactores, se pudo determinar la composición del biogás generado a los diferentes tiempos del proceso de FO. Para ambos microrreactores, los productos de la FO fueron bioH_2 y CO_2 . Como se puede observar en la **figura 4.3**, la producción de bioH_2 presentó un incremento en ambos microrreactores durante las 48 h de reacción. Enfatizando que, el microrreactor C/N 30 CT logró producir un volumen acumulado de 7 mL de bioH_2 al final del proceso, lo que representa un 43% más que el C/N 20 CT. A partir de las condiciones experimentales en este grupo, la producción de bioH_2 se vio favorecida trabajando con una relación C/N 30, esto se le podría atribuir a los efectos que tiene dicha relación C/N en el balance de nutrientes, así como la capacidad de amortiguar el pH de la codigestión,

retrasando la acidificación del medio y, por ende, la inhibición de la producción de bioH₂ (Hernández-Mendoza *et al.*, 2014; Lirio María Reyna-Gómez, 2021).

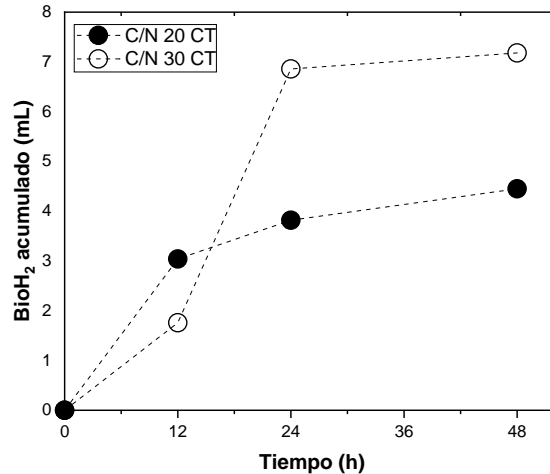


Figura 4.3. Volumen de bioH₂ acumulado a diferentes tiempos de reacción de los dos microrreactores pertenecientes al primer grupo (CT, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05).

el CT resultó ser eficiente inhibiendo el crecimiento de microorganismos metanogénicos, evitando la producción de CH₄, puesto que dicho gas no se detectó en ningún tiempo de muestreo. Esto podría ser atribuido a que los microorganismos metanogénicos son susceptibles a altas temperaturas y, a diferencia de especies productoras de bioH₂ como aquellas del género *Clostridium*, son incapaces de esporular en condiciones desfavorables, haciéndolas menos resistentes (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015; Madigan *et al.*, 2015; Lirio María Reyna-Gómez *et al.*, 2019).

Como parte del presente estudio en la evaluación de producción de bioH₂ vía fermentación oscura, se realizó el monitoreo de diversos parámetros fisicoquímicos como pH, CHT, DQO, ST y STV. Esto con el objetivo de conocer la cantidad de sustrato que está siendo consumido por los microorganismos a lo largo de la reacción, y, en el caso del pH, ver cómo evoluciona a lo largo de las horas durante la FO y como impacta en la producción de bioH₂.

El pH es uno de los factores con mayor importancia en el proceso de FO para la producción de bioH₂, pues afecta directamente las rutas metabólicas y la producción del gas de interés

(Lirio María Reyna-Gómez, 2021). En la **figura 4.4** se observa la evolución del pH en los microrreactores del primer grupo a lo largo de la FO, el pH al inicio del proceso de FO fue ajustado a 5.50 en ambos microrreactores. Para el microrreactor C/N 30 CT, la evolución del pH fue de 4.92 (12 h), 4.49 (24 h) y 4.37 (48 h), en cambio, para el microrreactor C/N 20 CT, las mediciones de pH fueron de 4.41 (12 h), 4.23 (24 h) y 4.06 (48 h). A las 24 h existe una coherencia con los resultados descritos hasta ahora, pues en este punto es donde mayor producción de bioH₂ hubo. En este tiempo, el microrreactor que mejor producción de bioH₂ tuvo (C/N 30 CT), presentó un pH de 4.49, este valor es ligeramente mayor que su contraparte C/N 20 CT, que fue de 4.23. Lo anterior nos indica una mayor eficiencia de la relación C/N 30 asociada a la amortiguación intrínseca del pH por parte de la codigestión (*Cruz-López et al., 2022*). Esto concuerda con lo reportado en la literatura, pues, entre más ácido sea el pH, menor será la producción de bioH₂ (*Łukajtis et al., 2018*). Si bien es ampliamente reportado que el pH óptimo para la producción de bioH₂ oscila entre 5.5-7 (*Mizuno et al., 2000; C. H. Wang et al., 2006*), hay autores que reportan valores de pH de 4.5 a 7 para la producción de bioH₂ utilizando residuos de la industria alimenticia como sustrato (*Ghimire et al., 2015*).

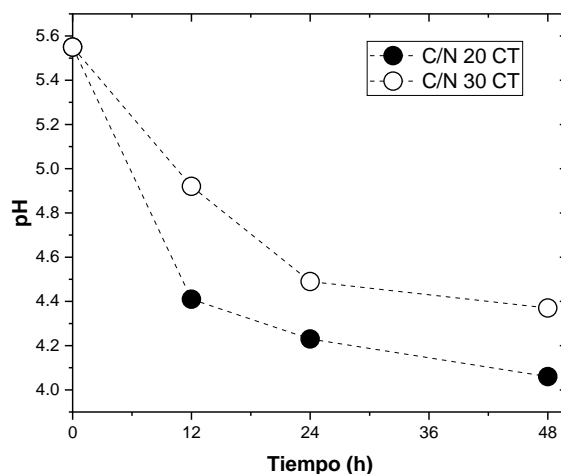


Figura 4.4. Evolución del pH a diferentes tiempos de reacción de los dos microrreactores pertenecientes al primer grupo (CT, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05).

Con respecto al consumo de CHT, se observó una tendencia similar en los dos microrreactores, siendo nuevamente el C/N 30 CT el que mayor eficiencia tuvo en todo el intervalo del estudio, presentando un consumo final del 35%, 10% más que el C/N 20 CT, el

cual solamente presentó un consumo final del 25% (véase **figura 4.5**). Lo anterior evidencia, nuevamente, que la relación C/N 30 favorece el consumo de materia orgánica y, por consiguiente, la producción de bioH₂.

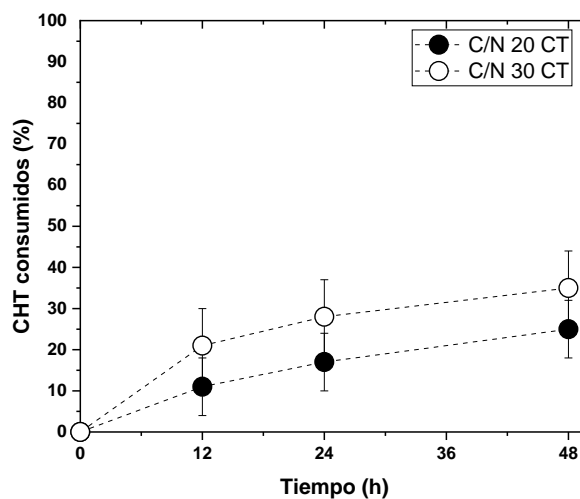


Figura 4.5. Porcentaje del consumo de CHT a diferentes tiempos de reacción de los dos microrreactores pertenecientes al primer grupo (CT, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05).

La DQO, además de referirse a la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar la materia orgánica y convertirla en CO₂ y H₂O, se refiere a el contenido orgánico biodegradable presente en los sustratos, tal y como se observa en la **figura 4.6**, el consumo de DQO en los microrreactores tratados con CT presenta una tendencia similar a la del consumo de CHT, siendo nuevamente, el C/N 30 CT, el que mayor consumo de DQO tuvo, alcanzando una remoción de hasta 60% al final de la FO, seguido del CN/ 20 CT, cuyo consumo de DQO al final de la reacción fue de 55%. La mayor remoción de DQO ocurrió en las primeras 12 horas de la reacción en ambos microrreactores CT. La eficiencia de la relación C/N 30 también fue observada en este parámetro. Esto es asociado a un posible mejor balance de nutrientes en el medio aunado a la mayor capacidad buffer de la relación C/N 30 (Lirio María Reyna-Gómez *et al.*, 2019), propiciando una mayor proliferación de microorganismos, permitiendo que tanto el consumo de materia orgánica, como la producción de bioH₂ hayan sido mejores en

el C/N 30 CT, pues el mismo patrón se observó en el consumo de ST y STV, donde esta serie presentó una mayor remoción al final del proceso de FO.

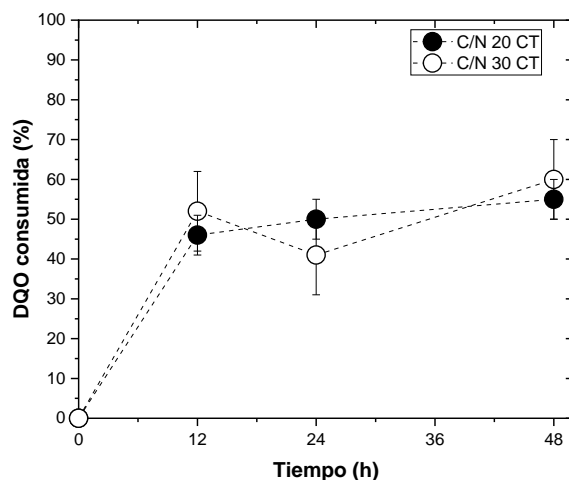


Figura 4.6. Porcentaje del consumo de DQO a diferentes tiempos de reacción de los dos microrreactores pertenecientes al primer grupo (CT, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05).

Uno de los subproductos más importantes en la FO, son los AGVs, porque la presencia de algunos metabolitos permite inferir si las rutas metabólicas inherentes al proceso de FO favorecen la producción de bioH_2 . Con base en el ácido graso dominante en el proceso de la FO, se pueden categorizar diferentes tipos de fermentación para la producción de bioH_2 : Fermentación tipo butirato-acetato, fermentación tipo propionato, fermentación tipo etanol y fermentación mixta (J. Wang & Yin, 2019). Los AGVs fueron medidos en cada tiempo de muestreo de ambos microrreactores pertenecientes al grupo tratado con CT, Los AGVs producidos en cada uno se muestran en la **figura 4.7**.

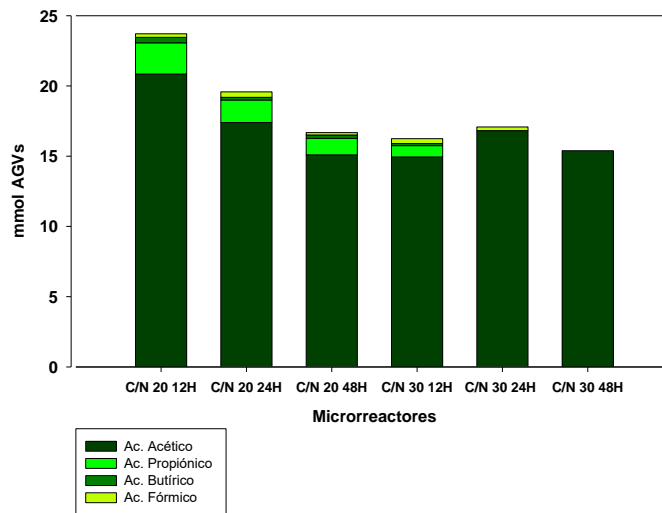


Figura 4.7. Concentración en mmol de AGVs a diferentes tiempos de reacción de los dos microrreactores pertenecientes al primer grupo (CT, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05).

En el caso del C/N 30 CT a las 12 h de reacción, además de ácido acético (15 mmol) también se cuantificó ácido propiónico (~1 mmol), ácido butírico (< 0.5 mmol) y ácido fórmico (< 0.5 mmol). Sin embargo, a las 24 y 48 h de la FO, el metabolito predominante fue el ácido acético. Por su parte, en el C/N 20 CT se puede observar el ácido acético (15-20 mmol) y el ácido propiónico (1-3 mmol) como metabolitos predominantes durante las 48 h del proceso además de trazas de ácido butírico y fórmico. Para este último experimento, el consumo de AGVs es evidente (de 23.5 a 17 mmol) y se podría atribuir a la actividad microbiana como resultado de la acidificación del microrreactor.

La predominancia del ácido acético podría confirmar que la ruta metabólica predominante favorece a la producción de bioH_2 (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015), sin embargo, la presencia de este metabolito no siempre resulta benéfica porque su acumulación en el sistema contribuye a la acidificación del medio (véase perfiles de pH en la **figura 4.4**), pues cuando el pH baja de 4.75, el ácido acético se protona y, dichas moléculas protonadas se impregnan en las células bacterianas a través de la difusión pasiva, disociando el citosol debido a una acumulación de aniones en la célula, lo que ocasiona una acidificación intracelular, lisando las células bacterianas (Sarkar *et al.*, 2021).

De acuerdo con Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015, la predominancia del ácido acético en todos los tiempos de muestreo de ambos experimentos, se podría interpretar como una eficiente producción del gas deseado, sin embargo, en el microrreactor C/N 20 CT hubo presencia de ácido propiónico en los tres tiempos de muestreo, lo cual impacta negativamente en la producción de bioH₂, ya que es ampliamente reportado que la aparición de este ácido graso inhibe la producción de bioH₂ (J. Wang & Yin, 2019), dicho subproducto solo fue detectado en pequeña proporción a las 12 h del C/N 30 CT, estando ausente en los demás tiempos de muestreo, reflejándose en la mayor producción de bioH₂ acumulado observada en este microrreactor. Cuando el ácido acético, además del ácido butírico predominan en el proceso, se le denomina fermentación tipo butirato-acetato. Este tipo de fermentación usualmente se da cuando en el sistema dominan especies del género *Clostridium* (J. Wang & Yin, 2019). Tal y como se observa en la **ecuación 4.1** y **4.2**, durante este tipo de fermentación, el rendimiento teórico de hidrógeno es el doble cuando el ácido acético es el producto final en vez del ácido butírico.



- Microrreactores tratados con UV

El segundo método de pretratamiento al inóculo a evaluar fue la radiación UV. Para tal objetivo se trabajó con el segundo grupo de microrreactores que consistía en dos microrreactores al igual que en el primer grupo tratado con CT; un microrreactor con C/N 20 y otro con C/N 30. En la **figura 4.8** se aprecia el volumen de biogás acumulado del segundo grupo de microrreactores, como se puede observar, el volumen acumulado fue de 5 mL para ambos microrreactores (C/N 20 UV y C/N 30 UV) a las 12 h, de 10 y 12 mL, respectivamente a las 24 h y 19 mL para ambos microrreactores a las 48 h. En este grupo de microrreactores no hubo diferencia importante en la acumulación de biogás. Al comparar estos resultados con los reportados en el grupo de microrreactores tratados con CT (**figura 4.2**), es evidente que los microrreactores con choque térmico fueron más eficientes en la producción de biogás, específicamente el C/N 30 CT.

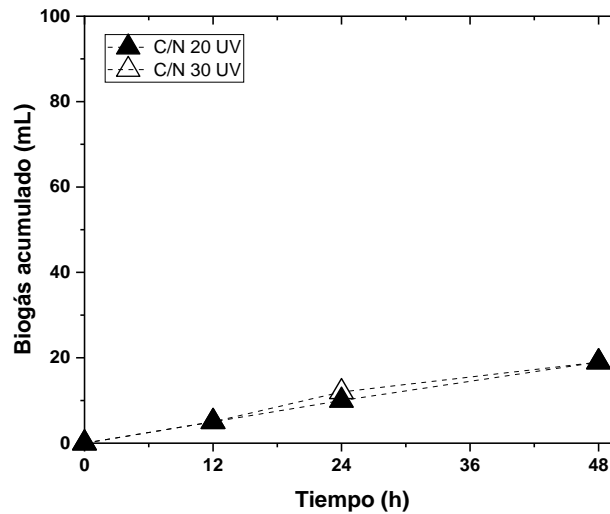


Figura 4.8. Volumen de biogás acumulado a diferentes tiempos de reacción de los dos microrreactores pertenecientes al segundo grupo (UV, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05).

Respecto a la cantidad de bioH_2 acumulado a lo largo de la FO en este segundo grupo, se puede apreciar en la **figura 4.9** los resultados de dicho grupo de microrreactores tratados con UV (C/N 20 UV y C/N 30 UV). Se puede observar que para ambos microrreactores la cantidad de bioH_2 acumulado fue de ~ 1 mL (12 h), ~ 2 mL (24 h) y 3.34 mL (48 h). Por lo tanto, no existe diferencia importante entre ambos sistemas.

Por otra parte, los análisis cromatográficos revelan que en este grupo de microrreactores, además de CO_2 , produjo hasta un 12% de CH_4 . De acuerdo con el análisis bibliográfico, existe la posibilidad de que la presencia de bacterias metanogénicas haya inhibido la producción de bioH_2 , por lo que la presencia de dicho gas, repercute de manera negativa para el presente propósito (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015; K. Zhang *et al.*, 2011).

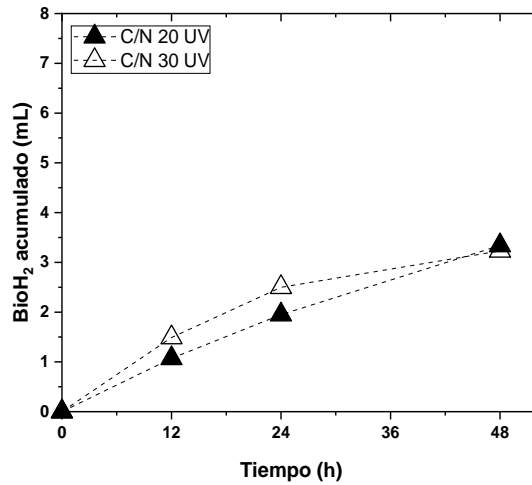


Figura 4.9. Cantidad de bioH₂ acumulado a diferentes tiempos de reacción de los dos microrreactores pertenecientes al segundo grupo (UV, 90 RPM, 28 ± 2°C, pH inicial 5.50 ± 0.05).

Al comparar el volumen de bioH₂ acumulado entre el grupo de microrreactores tratados con radiación UV y el grupo tratado con CT, a las 24 h, el microrreactor C/N 30 CT produjo 3 veces más de bioH₂ con respecto a los demás experimentos. Para los demás tiempos de reacción no se observaron cambios importantes.

Entre los parámetros fisicoquímicos evaluados en este grupo de microrreactores, se encuentra el pH, CHT, DQO, ST y STV. La **figura 4.10** muestra la evolución del pH de la codigestión NEJ-ARR a lo largo del proceso de FO en ambos microrreactores UV. Al igual que en el primer grupo de microrreactores, se ajustó el pH inicial a 5.50. El microrreactor C/N 30 UV presentó un perfil de pH de 4.79 (12 h), 4.54 (24 h) y 4.26 (48 h), mientras que el microrreactor C/N 20 UV presentó valores de pH muy similares: 4.79 (12 h), 4.58 (24 h) y 4.15 al final del proceso (48 h). Al comparar estos resultados con el grupo de microrreactores tratados con CT, es evidente que la codigestión NEJ-ARR en el microrreactor C/N 30 CT, mostró un mejor amortiguamiento del pH y, por consecuencia, el favorecimiento de las rutas metabólicas productoras de bioH₂ durante la FO en comparación a los microrreactores cuyo inóculo fue tratado con UV, donde la mayor acidificación de la codigestión inhibió la producción del gas deseado.

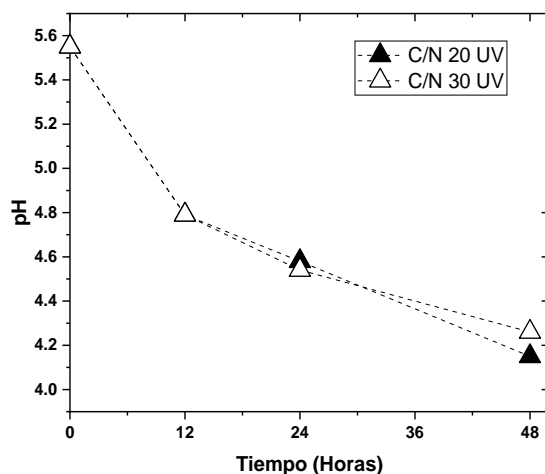


Figura 4.10. Evolución del pH a diferentes tiempos de reacción de los dos microrreactores pertenecientes al segundo grupo (UV, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05).

Respecto al porcentaje de consumo de CHT, el microrreactor C/N 30 UV presentó una remoción del 10% a las 12 h, 20% a las 24 h y 28 % a las 48 h. Mientras que en el caso del microrreactor C/N 20 UV, presentó una remoción de 37% a las 12 h, incrementándose hasta un 43% de consumo al final del proceso (véase **figura 4.11**). Al comparar estos resultados, el C/N 30 UV mostró valores muy similares al porcentaje de CHT consumidos por el grupo de microrreactores tratado con CT, pero con la diferencia que se detectó la presencia de CH_4 en el grupo tratado con UV y una mayor acidificación del pH con respecto al C/N 30 CT. De los cuatro microrreactores montados, el microrreactor C/N 20 UV fue el que mayor consumo de CHT presentó, este resultado podría ser atribuido a una posible mayor diversidad microbiana, pues, como se mencionó con anterioridad, en este experimento hubo presencia de CH_4 en todos los tiempos de muestreo.

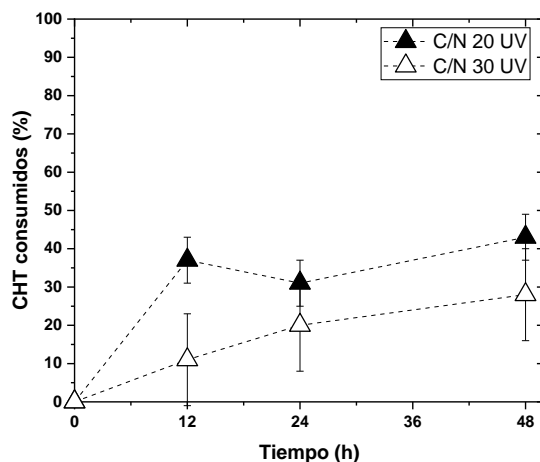


Figura 4.11. Consumo de CHT a diferentes tiempos de reacción de los dos microrreactores pertenecientes al segundo grupo (UV, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05).

En la **figura 4.12** se presenta el consumo de DQO a lo largo del proceso de la FO en el segundo grupo de microrreactores batch, evidenciando un comportamiento similar a la del consumo de CHT, pues nuevamente el microrreactor C/N 30 UV presentó un consumo de DQO en el intervalo de 55 a 66% durante las 48 h del proceso. Por su parte, el microrreactor C/N 20 UV presentó un mayor consumo de DQO, alcanzando una remoción superior al 70% durante la FO. Lo anterior representa una mejora de hasta el 22% de remoción de DQO en contraste con el primer grupo de microrreactores tratados con CT. Al igual que en dicho grupo, la mayor remoción de DQO ocurrió durante las primeras 12 horas de la FO. La mayor eficiencia en la remoción de DQO de los microrreactores tratados con UV es nuevamente asociada a una posible mayor diversidad microbiana en dicho grupo de microrreactores. El mismo patrón se observó en el consumo de ST y STV, en donde el microrreactor con mayor remoción de sólidos fue el C/N 20 UV alcanzando un 18% de remoción de ST y STV al final del proceso.

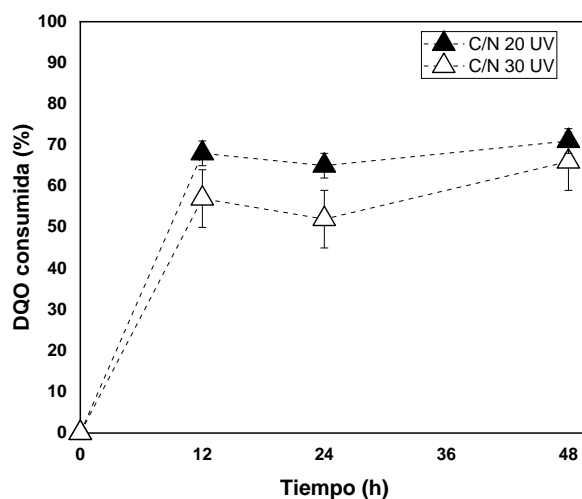
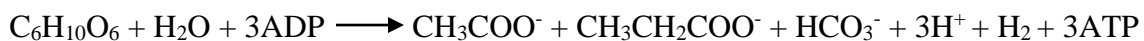


Figura 4.12. Consumo de DQO a diferentes tiempos de reacción de los dos microreactores pertenecientes al segundo grupo (UV, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05).

Los microreactores tratados con UV resultaron ser más eficientes removiendo la materia orgánica del sistema, sin embargo, en términos de producción de bioH_2 resultaron ser muy inferiores comparados con los microreactores tratados con CT, pues se obtuvo la mitad de bioH_2 acumulado al final de la FO, teniendo pobres rendimientos que oscilan de 1 a 3 mL H_2/gSTV cuando el pretratamiento UV es aplicado al inóculo, valores también inferiores a los reportados en la literatura (Cieciura-Włoch & Borowski, 2019; Gomez-Romero *et al.*, 2014), por lo que se evidencia el pobre efecto que tiene el tratamiento UV del inóculo para la producción de bioH_2 (Basak *et al.*, 2018).

Este bajo rendimiento puede ser evidenciado, de igual manera, con los subproductos generados a lo largo del proceso, pues, como se aprecia en la **figura 4.13**, en aquellos microreactores tratados con UV (C/N 20 UV y C/N 30 UV), pese a que el metabolito principal fue el ácido acético (22 a 30 mmol), se observa una mayor concentración de ácido propiónico (4.5-8 mmol) a diferencia de los grupos de microreactores tratados con CT en donde este subproducto se detectó por concentraciones < 3 mmol. La producción de este ácido graso es indicador de una inhibición de la producción de bioH_2 (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015), lo cual, se puede comprobar en la pobre producción de bioH_2 cuando se empleó este método de pretratamiento al inóculo, además de que el CH_4 siempre estuvo

presente en cada muestra. Debido a que la concentración de ácido propiónico fue muy alta respecto a otros sistemas de FO reportados en la literatura a partir de codigestiones de aguas residuales de la industria de alimentos, se puede determinar que existió la presencia de una fermentación de tipo propionato. Dicha fermentación es ampliamente reportada en diversos estudios por ser la más pobre en cuanto a la producción de bioH₂ pues en ella, solo un mol de H₂ es producido, tal y como se observa en la **Ecuación 4.3** (J. Wang & Yin, 2019).



Ec. 4.3

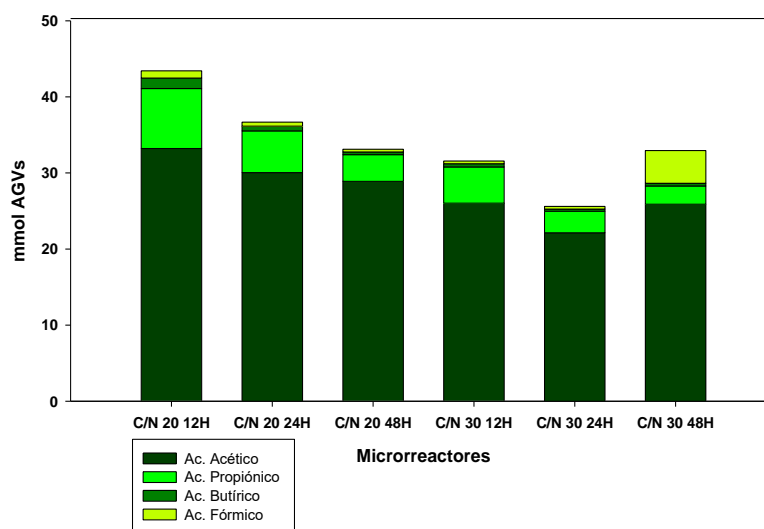


Figura 4.13. Concentración en mmol de AGVs a diferentes tiempos de reacción de las dos series de microrreactores pertenecientes al segundo grupo (UV, 90 RPM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pH inicial 5.50 ± 0.05).

4.3.2. Rendimiento de bioH₂ en los microrreactores

Si bien el microrreactor C/N 20 CT presentó un mayor rendimiento en la producción de bioH₂, con un valor de 4 mL H₂/gSTV en contraste con el C/N 30 CT que tuvo valores de 3.68 mL H₂/gSTV. Este último, debido al mayor consumo de materia orgánica y biogás producido, resultó ser el más eficiente. En cuanto a los microrreactores del grupo tratado con UV, se obtuvieron valores inferiores de rendimiento, con tan solo 1.40 mL H₂/gSTV en el caso del C/N 20 UV, mientras que para el C/N 30 UV no fue posible realizar el cálculo de rendimiento debido a inconsistencias en la determinación de STV. Cieciora-Włoch &

Borowski, 2019, obtuvieron un rendimiento de 8.02 mL H₂/gSTV utilizando residuos animales, bajo condiciones similares a las empleadas en el presente trabajo. Sin embargo, no reportan el consumo de DQO, el cual en el presente estudio, empleando CT como método de pretratamiento del inóculo, se obtuvieron valores que oscilan del 55 al 60%, valores más altos que los reportados por Reyna-Gómez, 2021 donde obtuvo una remoción de DQO del 50% utilizando una codigestión de cáscara de frutas y lodos primarios y que los reportados por Gomez-Romero *et al.*, 2014, que obtuvieron apenas un 16% de remoción en la DQO usando una codigestión de suero de leche con residuos de frutas y vegetales.

4.3.3. Análisis cinético de la producción de bioH₂ vía FO

Para describir el proceso de producción de bioH₂ vía FO a nivel microrreactor, los datos experimentales obtenidos durante la operación de los microrreactores, fueron analizados con la ecuación de Gompertz modificada presentada en el subtema 3.5.1.1 del capítulo 3. De esta manera se obtuvieron los parámetros cinéticos mostrados en la **tabla 4.2**.

Tabla 4.2. Coeficientes de la ecuación de Gompertz modificada para la producción de bioH₂.

| microrreactor | C/N | Tratamiento | Hmax (mLH ₂ /L) | Rmax (mLH ₂ /L h) | λ (h) | r ² |
|---------------|-----|-------------|-------------------------------|---------------------------------|-------|----------------|
| C/N 20 UV | 20 | UV | 6.97 | 0.16 | 6.63 | 0.999 |
| C/N 30 UV | 30 | UV | 3.98 | 12.89 | 11.89 | 0.908 |
| C/N 20 CT | 20 | CT | 6.59 | 1.79 | 10.31 | 0.925 |
| C/N 30 CT | 30 | CT | 8.83 | 13.61 | 11.88 | 0.942 |

La tendencia de la producción de bioH₂ fue descrita adecuadamente por este modelo, mostrando coeficientes de correlación (r²) de 0.91-1. Las fases de latencia para los cuatro grupos de microrreactores se presentaron antes de las 12 horas, siendo los que presentaban una C/N 30 los que obtuvieron una fase de adaptación más larga. Los valores de Hmax fueron mayores para los microrreactores tratados con CT, con valores de 6.59 y 8.83 mLH₂/L para los microrreactores C/N 20 CT y C/N 30 CT, respectivamente. La Rmax fue mayor en los sistemas con relación C/N 30, eso puede estar asociado al mayor contenido de CHT en esta relación en contraste con la relación C/N 20.

En la **figura 4.14** se puede apreciar la producción acumulativa de bioH₂ obtenida en los cuatro grupos de microrreactores montados. En la figura se evidencia el potencial de producción de bioH₂ del sistema cuando el inóculo es tratado con CT, potencial que se ve notoriamente mejorado cuando los sustratos se mezclan a una relación C/N 30, pues bajo estas condiciones se logró obtener el Hmax, además de una mayor velocidad de producción de bioH₂ en contraste con los otros sistemas, alcanzando una tasa de producción de 13.61 mLH₂/L h.

Los anteriores resultados muestran que, mediante este sistema, es posible el aprovechamiento de éstas aguas residuales para la generación de energía renovable, pues, operando los biorreactores bajo condiciones específicas, es posible lograr una producción de bioH₂ competitiva, además de, paralelamente, suministrar un tratamiento a las aguas residuales como el nejayote y el ARR, que representan un problema de contaminación de los mantos acuíferos (Del Angel-Acosta *et al.*, 2021; España-Gamboa *et al.*, 2018).

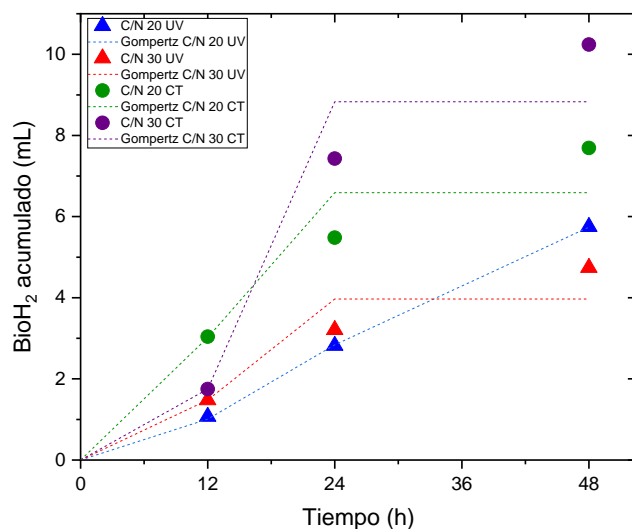


Figura 4.14. Ajuste de la producción acumulativa de bioH₂ mediante la ecuación de Gompertz modificada para los microrreactores.

4.4. Operación de biorreactores batch de 3 L.

Después de haber determinado el potencial de producción de bioH₂ de la codigestión NEJ-ARR en los microrreactores batch, se procedió a montar 3 biorreactores de 5 L con un

volumen de trabajo de 3 L. Dichos biorreactores se montaron con la relación C/N que fue más favorecedora en la producción de bioH₂ a nivel microrreactor. Además, para esta fase experimental, se evaluó nuevamente el método de pretratamiento del inóculo ahora a una escala de 3 L, aunado al impacto que tiene el medio RCM en la producción de bioH₂.

La operación de los biorreactores batch de 3 L se llevó a cabo durante 72 horas para el RBL1 y RBL2 y, durante 60 horas para el RBL3. Así mismo, se evaluaron los parámetros fisicoquímicos descritos anteriormente, así como la composición del biogás cada 12 horas. Para este caso, los tres biorreactores se operaron a una temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$, una agitación constante de 40 RPM y bajo un pH controlado de 5.50 ± 0.05 .

4.4.1. Producción de biogás y bioH₂

La producción de biogás fue monitoreada cada 12 horas en los biorreactores operados en modalidad batch. Como se mencionó en el apartado 3.5.2 del presente trabajo, el RBL1 y RBL2 operaron durante 72 horas y el RBL3 fue operado durante 60 horas. La **figura 4.15** ilustra el volumen de biogás acumulado a lo largo del proceso de FO en los tres biorreactores batch. El volumen de biogás acumulado fue mayor en el RBL2 alcanzando un total de 1180 mL (72 h) en contraste con el RBL1 que fue de 1050 mL al final del proceso de FO. En ambos casos no se observó presencia de metano en ningún tiempo de muestreo. Por otro lado, el RBL3 tuvo un volumen de biogás acumulado de 1660 mL (60 h), y fue mayor que ambos biorreactores batch tratados con CT.

Para los biorreactores RBL1 y RBL2, los análisis por CG de las muestras de biogás revelaron que los productos de la FO fueron únicamente bioH₂ y CO₂, lo cual reafirma la eficiencia del CT como pretratamiento del inóculo ya que inhibió microorganismos metanogénicos. Tal y como se observa en la **figura 4.16**, la producción acumulativa de bioH₂ fue mayor en el RBL1 durante las primeras 24 horas de la FO, sin embargo, esta tendencia se invierte después de las 24 horas, siendo el RBL2 el que mayor cantidad de bioH₂ acumulado obtuvo, con un total de 450 mL a las 72 horas, lo que representa un 20% más que el RBL1, evidenciando que el RCM solo tiene un impacto positivo en la producción de bioH₂ durante las primeras 24 horas de la FO. Por otra parte, el RBL3 fue el menos eficiente en la producción de bioH₂, pues, al igual que en los microrreactores, hubo presencia de CH₄ en biogás en todos los tiempos de muestreo, representando hasta un 19% del biogás generado.

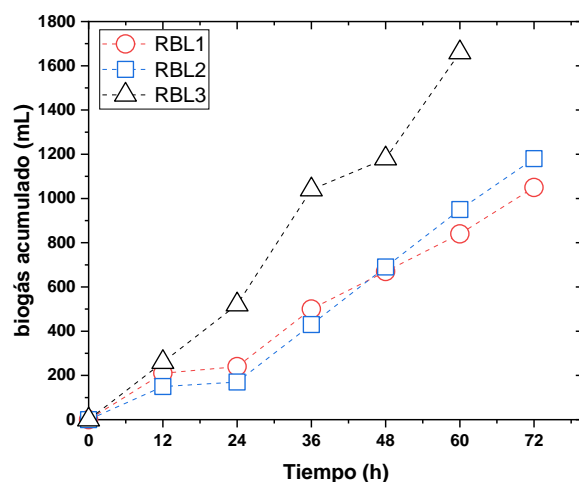


Figura 4.15. volumen de biogás acumulado a diferentes tiempos de reacción en los tres biorreactores batch (40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$).

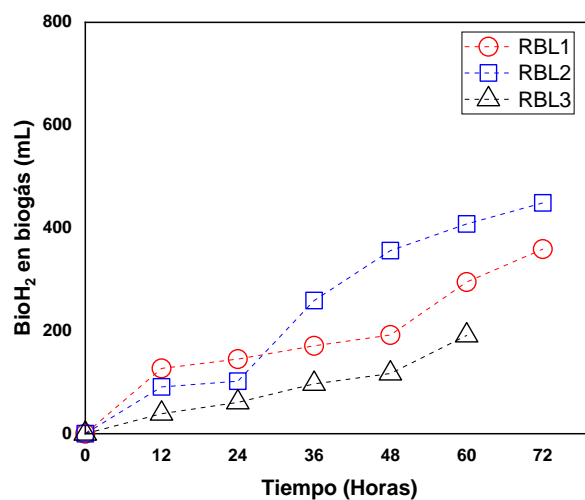


Figura 4.16. Cantidad de bioH₂ acumulado a diferentes tiempos de reacción en los tres biorreactores batch (40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$).

En cuanto al rendimiento y la productividad de bioH₂ en los biorreactores batch de 3 L, se observan las mismas tendencias que en el bioH₂ acumulado, siendo el RBL2 ligeramente más eficiente que el RBL1, y el RBL3 siendo el menos favorable para este fin. La **tabla 4.3** muestra el rendimiento y la productividad de bioH₂ en diversos estudios empleando distintos sustratos y lodo granular como inóculo. Los resultados obtenidos en el presente trabajo en

cuanto a rendimiento resultan mejores que los mostrados en estos estudios, presentando hasta 10 veces más de rendimiento en las condiciones adecuadas. Por otra parte, la productividad de bioH₂ en este trabajo resulta ligeramente menor que los estudios mencionados, lo que podría deberse a la complejidad de los sustratos empleados en el presente trabajo, pues el tiempo de adaptación de los microorganismos a la fuente de carbono utilizada (NEJ) es mayor (España-Gamboa *et al.*, 2018).

Tabla 4.3. Comparativa de rendimiento y productividad en la producción de bioH₂ en diversos estudios

| Operación | Codigestión | Inóculo y pretratamiento | Condiciones de operación | Rendimiento (mLH ₂ /gSTV) | Productividad (mLH ₂ /L h) | Referencia |
|-----------------|--|--------------------------|---|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| Continua | Agua residual de cervecería + suero de queso | Lodo granular, CT | C/N = 30, pH = 5.5, T = 35°C, V = 2 L, TRH = 9h | 139 mLH ₂ /gDQO | 14 | (Cruz-López <i>et al.</i> , 2022) |
| Batch | Cascara de frutas + lodos primarios | Lodo granular, CT | C/N = 30, pH = 5.5, T = 37°C, V = 0.1 L | 25 | 2.6 | (Lirio María Reyna-Gómez, 2021) |
| Batch | Residuos de frutas y vegetales | Lodo granular, CT | C/N = No reportada, pH 5.5, T = 35°C, V = 0.5 L. | 60 | 1.58 | (García-Peña <i>et al.</i> , 2013) |
| Batch | Residuos municipales + residuos de alimentos | Lodo granular, CT | C/N = No reportada, pH = 4.0, T = 30°C, V = 0.125 L | 14 | No reportado | (Abubackar <i>et al.</i> , 2019) |
| Bach | RBL1 | Lodo granular, CT | C/N = 30, pH = 5.5, T = 35±2°C, V = 3 L. | 112 | 1.96 | Presente trabajo |
| Batch | RBL2 | Lodo granular, CT | C/N = 30, pH = 5.5, T = 35±2°C, V = 3 L. | 196 | 2.20 | Presente trabajo |
| Batch | RBL3 | Lodo granular, UV | C/N = 30, pH = 5.5, T = 35±2°C, V = 3 L. | 38 | 0.94 | Presente trabajo |

*CT = Choque térmico; T = Temperatura; V = Volumen; TRH = Tiempo de retención hidráulico.

4.4.2. Monitoreo de parámetros fisicoquímicos y consumo de sustratos

Al igual que en los microrreactores, en los biorreactores batch de 3 L también fueron monitoreados parámetros fisicoquímicos como pH, CHT, DQO, ST, STV a lo largo del proceso con el objetivo de ver la evolución de la FO y el consumo de sustratos. De esta manera, dichos análisis fisicoquímicos fueron realizados cada 12 horas hasta el final de la reacción para los tres biorreactores batch.

Para este caso, el biorreactor Biostat A marca Sartorius, cuenta con un software que permite el control de la temperatura y agitación, así como el monitoreo del pH y un constante ajuste. Por tal motivo, el pH, a diferencia de los microrreactores, siempre se mantuvo constante durante todo el proceso de FO con valores de 5.50 ± 0.05 , tal y como se muestra en la **figura 4.17**.

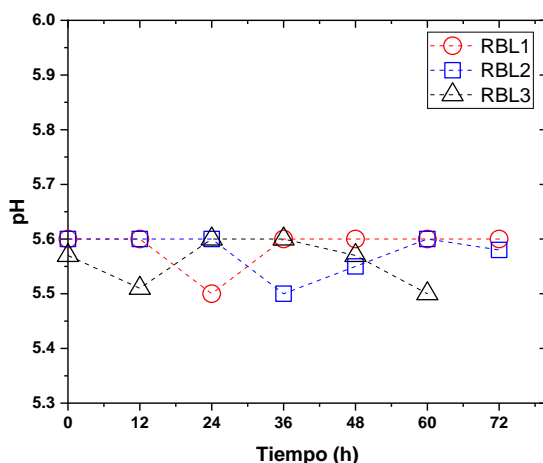


Figura 4.17. Valor de pH a diferentes tiempos de reacción en los tres biorreactores batch (40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$).

El control del pH en la FO es de suma importancia, pues, tal y como se observó en los microrreactores, el pH tiende a acidificarse, teniendo un impacto en la diversidad microbiana y en el posible cambio de rutas metabólicas. Es por ello que, al mantener un pH constante de alrededor 5.50 ± 0.05 se podría mejorar la robustez del sistema, debido que dicho valor de pH es el óptimo reportado para la producción de bioH_2 (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015; Mizuno *et al.*, 2000).

En cuanto al porcentaje de consumo de CHT (véase **figura 4.18**), se observaron comportamientos similares de 20% en el RBL1 y RBL2 en las primeras horas, alcanzando un consumo total final de 37% y 23%, respectivamente, un consumo notoriamente menor que el biorreactor RBL3, pues este tuvo un consumo final de 70%, lo cual se le podría atribuir a la mayor diversidad microbiana presente en dicho biorreactor asociado al tratamiento UV del inóculo (H. Wang *et al.*, 2012; K. Zhang *et al.*, 2011). En este parámetro, no se observa algún impacto importante del medio RCM, pues el consumo de CHT fue muy similar en el RBL1 y RBL2.

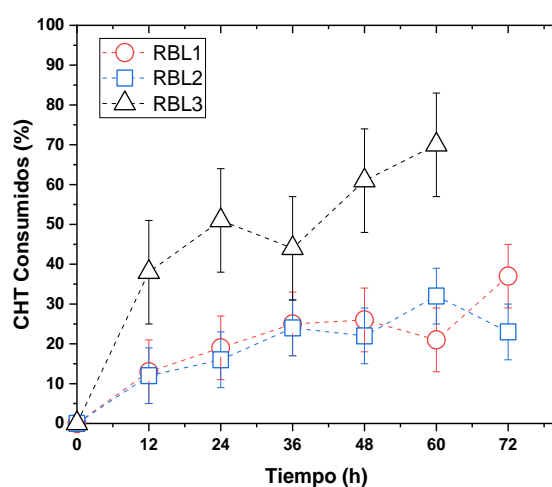


Figura 4.18. Porcentaje de consumo de CHT a diferentes tiempos de reacción en los tres biorreactores batch (40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$).

Para los análisis de DQO, se observó un comportamiento similar en los tres biorreactores, teniendo una remoción promedio de $32 \pm 10\%$, $28 \pm 9\%$ y $30 \pm 4\%$, para el RBL1, RBL2 y RBL3, respectivamente. Como se observa en la **figura 4.19**, al igual que en los microrreactores, el mayor consumo de DQO se obtuvo en las primeras 12 horas de la FO, alcanzando hasta un 47% de remoción en el RBL1. La remoción de DQO, pese al alto contenido de ésta en los sustratos empleados, fue ligeramente mayor que la reportada por Garcia-Peña *et al.*, 2013, en donde reporta una remoción del 25% utilizando residuos de frutas y vegetales como sustratos y LGA tratado con CT como inóculo bajo las mismas condiciones de operación que en el presente trabajo. Si bien la DQO en el RBL3 fue muy similar a la de los otros dos biorreactores, en este último biorreactor se produjo más biogás y

hubo un mayor consumo de CHT, lo que podría ser atribuido al metabolismo de los microorganismos presentes en dicho sistema (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015).

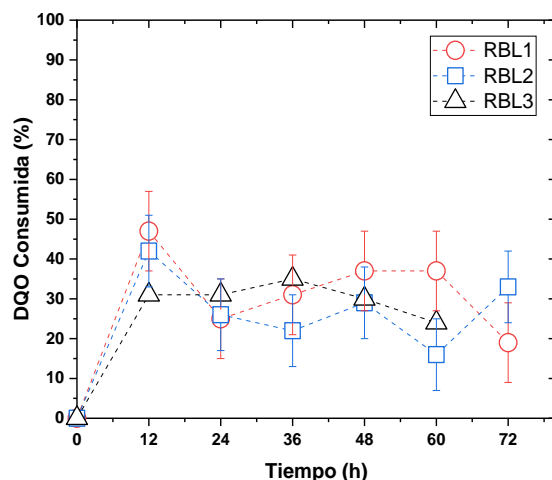


Figura 4.19. Remoción de DQO a diferentes tiempos de reacción en los tres biorreactores batch (40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$).

El consumo de ST y STV se muestra en la **figura 4.20**. Los ST representan la materia sólida que está suspendida o asentada en un líquido que permanecen luego de la evaporación y secado de una muestra, mientras que los STV representan la cantidad de materia orgánica capaz de ser biodegradada y de volatilizarse por efecto de calcinación a 550°C . El RBL1 tuvo una remoción final de ST del 13%, más del doble que el RBL2, cuya remoción final fue de tan solo el 6%. Por otro lado, el RBL3 fue el biorreactor que mayor consumo de ST tuvo al final de la reacción, llegando a ser del 18%. Esta misma tendencia se observó en la remoción de STV, los biorreactores RBL1 (359 mL bioH₂, > %DQO) y RBL2 (450 mL bioH₂, < %DQO) tuvieron un consumo del 27% y 17% al final de la reacción, y nuevamente el RBL3 fue el biorreactor con mayor consumo, llegando a ser del 39% (en conjunto a la mayor producción de biogás y mayor % de remoción de CHT).

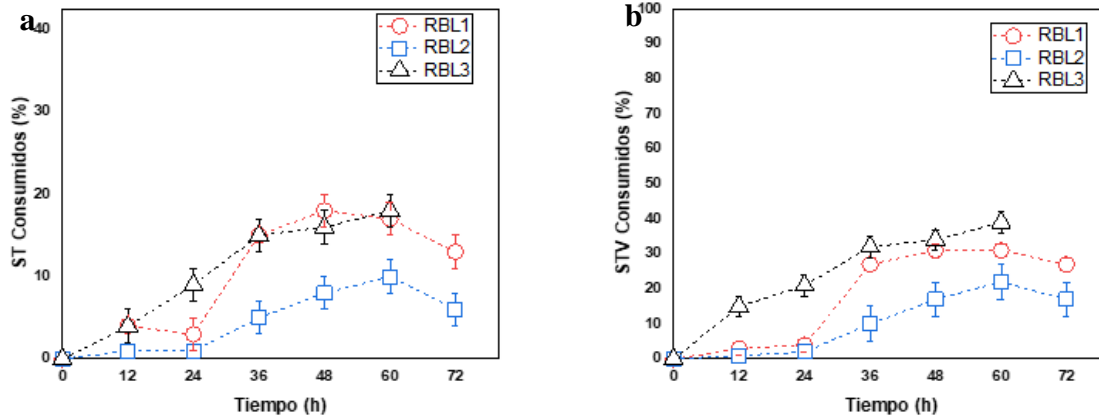


Figura 4.20. a) Remoción de ST a diferentes tiempos de reacción en los tres biorreactores batch; b) Remoción de STV a diferentes tiempos de reacción en los tres biorreactores batch. (40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$).

4.4.3. Producción de ácidos grasos volátiles (AGVs)

En la **figura 4.21** se aprecia la evolución de los AGVs generados a lo largo de la FO para los biorreactores RBL1 y RBL2, a las 12, 24, 48 y 72 h; y en el caso del RBL3 los tiempos de análisis fueron a las 12 y 60 h. Los subproductos generados a lo largo de la FO en el RBL1 muestran una clara predominancia de ácido acético (18 a 24 mmol) seguido de ácido fórmico (2 a 5 mmol), ácido propiónico (~ 1 mmol) y, finalmente ácido butírico (< 1 mmol). Lo anterior nos indica una fermentación tipo butirato-acetato, en donde la producción de bioH_2 es favorecida (J. Wang & Yin, 2019). La concentración máxima de AGVs acumulados para el RBL1 se dio a las 12 horas con una concentración total de AGVs de 38 mmol, de los cuales 27 mmol corresponde al ácido acético. Así mismo, a las 12 horas se dio la máxima producción de bioH_2 alcanzando 127 mL y un 66% de bioH_2 presente en el biogás. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Khamtib & Reungsang, 2014, quienes obtuvieron una mayor producción de bioH_2 cuando el ácido acético en conjunto con el butírico predominaron en el proceso de FO utilizando una codigestión de hidrolizado de tronco de palma con ARR como sustrato.

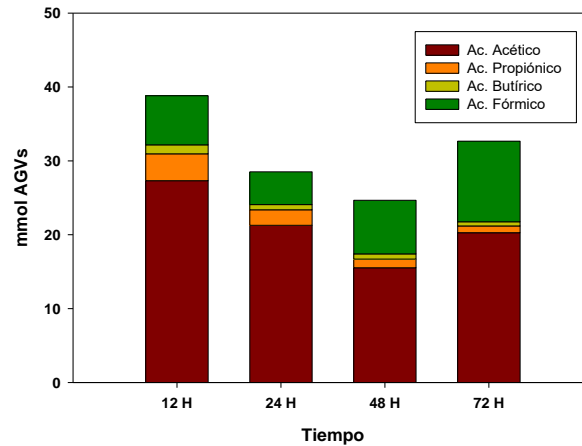


Figura 4.21. Concentración en mmol de AGVs a lo largo de la FO en el RBL1. (40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$).

En la **figura 4.22** se presenta la producción de AGVs del RBL2, en donde de igual manera se puede observar que en las primeras 48 h el ácido acético predomina de 10 a 18 mmol respecto a los demás AGVs generados (ácido fórmico = 3-5 mmol; ácido propiónico = < 1 mmol; y trazas de ácido butírico), pero en el muestreo realizado a las 72 h, la concentración de ácido fórmico (12 mmol) predomina como subproducto generado seguido por el ácido acético (9 mmol). Al comparar los resultados de ambos experimentos (RBL1 y RBL2) se observa lo siguiente: 1) la disminución de la concentración de los AGVs de 39 a 28 mmol, destacando un 30 % de la concentración del ácido acético en el RBL1 mientras que el RBL2, el volumen de AGVs fue en promedio de 24 mmol y con un consumo de ácido acético menor del 10 %. 2) una menor variación de la concentración de AGVs en el RBL2, la cual podría asociarse con la aclimatación de las bacterias productoras de bioH₂ y a una menor remoción de DQO. 3) a las 72 h se incrementó la concentración de ácido fórmico en ambos experimentos, pero en el RBL2 también se observó el aumento del porcentaje de remoción de DQO, por lo que este fenómeno se le podría atribuir a cambios en las rutas metabólicas presentes. Lo anterior es atribuido a una diferente diversidad microbiana que propicia la formación de ácido fórmico, el cual no está relacionado con la producción eficiente de bioH₂ como el ácido acético o butírico (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015).

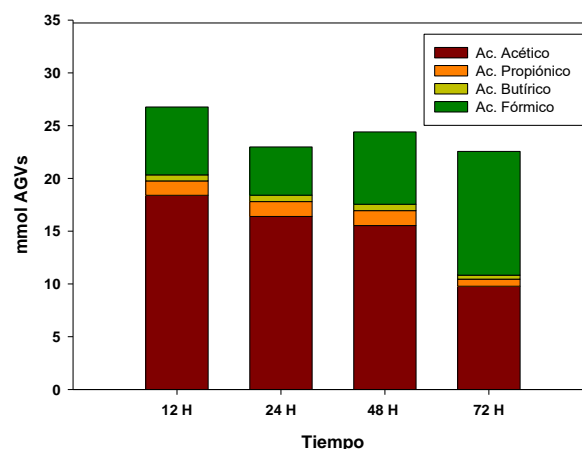


Figura 4.22. Concentración en mmol de AGVs a lo largo de la FO en el RBL2. (40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$).

En la **figura 4.23** se observa el contenido de AGVs producidos a las 12 y 60 horas en el RBL3. En este biorreactor, la acumulación de AGVs fue mayor en comparación a los dos sistemas anteriores, alcanzando concentraciones de 43 mmol a las 12 horas de la FO, lo cual es perjudicial para el proceso, pues una alta acumulación de AGVs en el sistema, propicia el aumento de la fuerza iónica del medio, resultando en el cambio en la producción de bioH_2 a solventes (Chong *et al.*, 2009). Además, en este sistema hubo una mayor concentración de ácido fórmico, 13 mmol y 11 mmol a las 12 y 60 horas, respectivamente. Esto podría ser atribuido a la diferente diversidad microbiana presente en el sistema, causa del pretratamiento UV del inóculo, el cual no inhibe el crecimiento de bacterias metanogénicas y consumidoras de hidrógeno, así como algunas bacterias anaerobias facultativas.

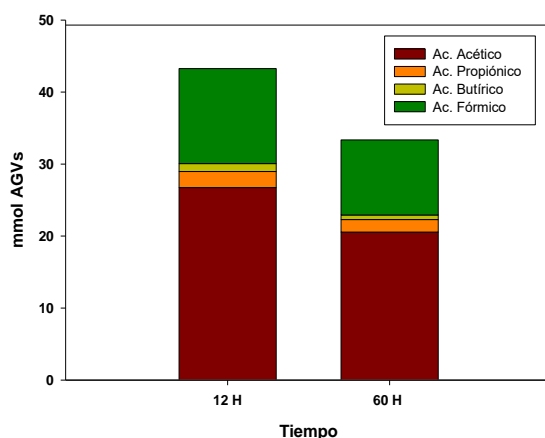


Figura 4.23. Concentración en mmol de AGVs a lo largo de la FO en el RBL3. (40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$).

4.4.4. Análisis de la diversidad microbiana de los biorreactores batch de 3L

La óptima producción de bioH_2 y el desempeño del biorreactor dependen de la diversidad microbiana presente en el sistema, pues como se mencionó con anterioridad, existen diversos tipos de microorganismos que se consideran como productores de bioH_2 , mientras que otros lo consumen (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015).

Para conocer el microbioma presente en los diferentes biorreactores, se tomaron muestras en diferentes tiempos de reacción para los biorreactores batch, se realizó la extracción de ácidos nucleicos y se identificaron por secuenciación de amplicones usando la plataforma MiSeq Illumina.

La **figura 4.24** muestra la clasificación taxonómica y el microbioma a nivel de filo presente en el RBL1 a las 24 y 72 h. Se identificó el 99 y 100%, respectivamente de las secuencias. El filo *Firmicutes* predominó en ambos tiempos de muestreo, con valores del 90 y 96%, respectivamente. Las bacterias del filo *Firmicutes* son hidrolíticas, es decir, descomponen las macromoléculas presentes en azúcares simples, la mayor presencia de este filo a las 72 h del RBL1 se vio reflejada en el consumo de CHT, pues en este tiempo de muestreo se obtuvo una remoción del 37%, mayor a los demás tiempos (Lirio María Reyna-Gómez, 2021). Además, se detectó la presencia del filo *Proteobacteria* y *Chloroflex*, que, en conjunto con las bacterias del filo *Firmicutes*, también participan en la segunda etapa de la FO (Acidogénesis), convirtiendo azúcares en AGVs (Dzulkarnain *et al.*, 2022).

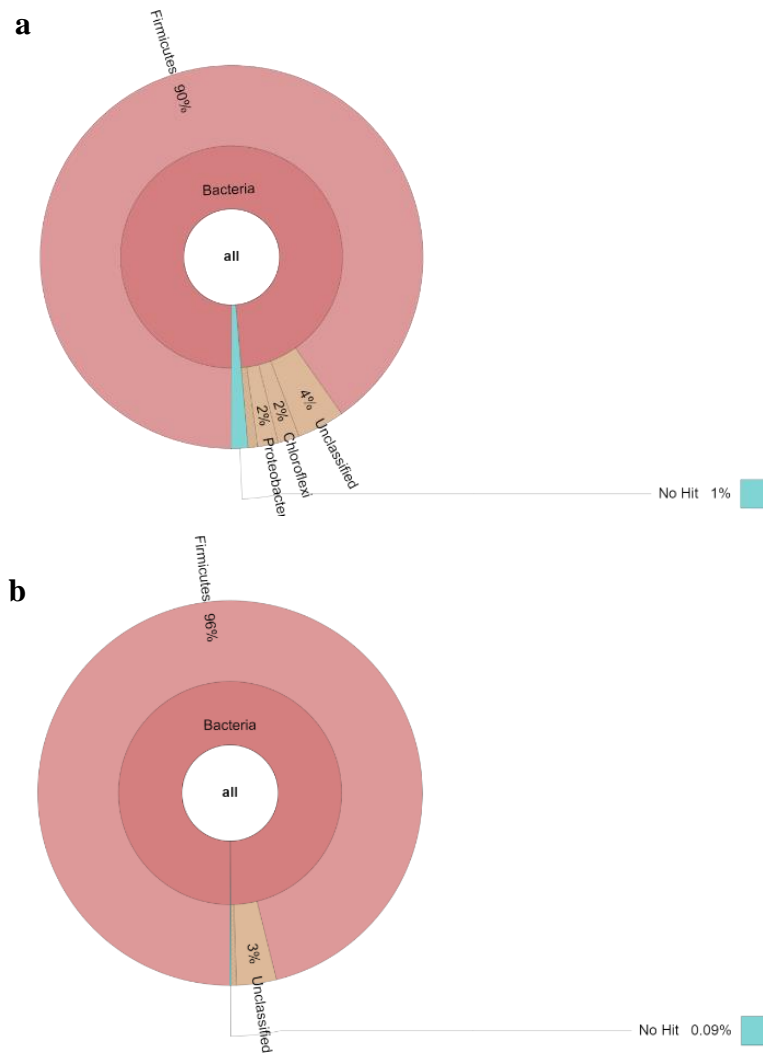


Figura 4.24. Clasificación taxonómica a nivel filo del microbioma del RBL1. a) 24 h de FO; b) 72 h de FO. (40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$).

A nivel género, *Clostridium* fue el predominante en ambos tiempos, con un 87% y 68% de presencia a las 24 y 72 horas, respectivamente. Como se puede ver en la **figura 4.25** a las 24 h hubo una mayor presencia de *Clostridium butyricum* (87%), seguido de *Clostridium beijerinckii* con tan solo un 1% de los *Clostridium* totales. Mientras que, a las 72 h, hubo una mayor diversidad de bacterias de este género, siendo *Clostridium lundense* la especie más abundante, representando el 25%, seguido de *Clostridium* sp con un 13%. *C. beijerinckii* con 12%, *C. butyricum* con un 9%, *Clostridium sporogenes* con 5% y, por último, *Clostridium oryzae* con un 1%. La mayor diversidad de especies de *Clostridium* a las 72 h podría estar

relacionada al mayor consumo de CHT que se presentó a este tiempo de muestreo con respecto al consumo de CHT a las 24 h. Así mismo, a las 72 h hubo una mayor presencia de microorganismos del género *Lactobacillus* con alrededor de un 28% de los microorganismos totales lo que podría coadyuvar a la acumulación de ácido fórmico, pues es ampliamente reportado que las especies anaerobias facultativas como *Lactobacillus* propician la acumulación de este metabolito (Shin *et al.*, 2010; Q. Zhang *et al.*, 2020).

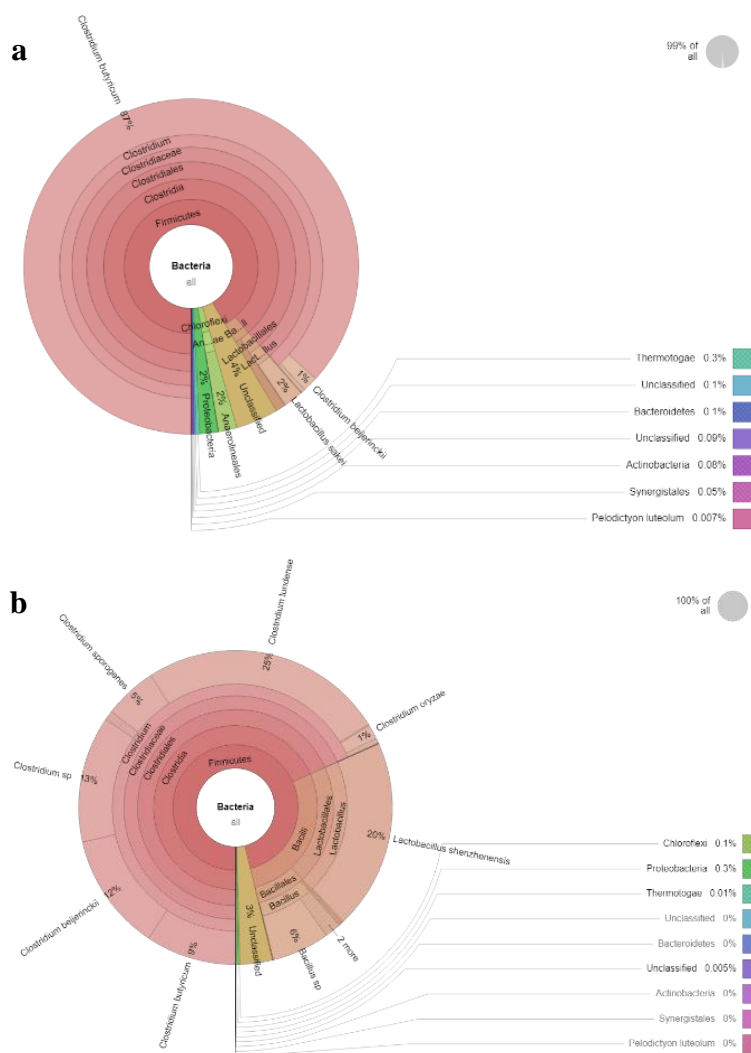


Figura 4.25. Clasificación taxonómica a nivel especie del microbioma del RBL1. a) 24 h de FO; b) 72 h de FO. (40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$).

C. butyricum es ampliamente reportado en la literatura como productor de bioH₂ bajo condiciones mesofílicas (Dzulkarnain *et al.*, 2022). Es conocido por su alta tasa de conversión de bioH₂ independientemente de la complejidad del sustrato, pues se ha reportado un rendimiento máximo de bioH₂ de hasta 3.6 mol H₂/mol de hexosa utilizando *C. butyricum* y residuos orgánicos, acercándose al máximo valor teórico de rendimiento de bioH₂ (4 mol H₂/mol de hexosa) (Kivistö *et al.*, 2013). Otros autores han reportado un rendimiento de 1.98 molH₂/mol de glucosa y 1.5 molH₂/mol de glucosa cuando se utiliza como sustrato glucosa pura y almidón hidrolizado, respectivamente, usando como inóculo *C. butyricum* (Argun *et al.*, 2009; Baeyens *et al.*, 2020). Se cree que la alta tasa de producción de bioH₂ en esta especie se debe a la presencia del gen *hydA* en su genoma, el cual es encargado de codificar las hidrogenasas, proteínas involucradas en la producción de bioH₂ a partir del metabolismo de monosacáridos (M. Y. Wang *et al.*, 2008).

Otra especie que predominó en la FO en este biorreactor fue *C. beijerinckii*, El cual, en conjunto con *C. butyricum*, está catalogado como uno de los anaerobios estrictos productores de bioH₂ con mayor eficiencia, con un rendimiento teórico de hasta 4 moles por mol de glucosa. Sin embargo, en la práctica, estos valores siempre están por debajo de los 2 moles de bioH₂ (Behera & Varma, 2016; Dzulkarnain *et al.*, 2022). Esta especie es usualmente predominante en consorcios microbianos utilizados para la producción de bioH₂ bajo condiciones mesofílicas. García-Depraect & León-Becerril, 2018 reportaron una predominancia de *C. beijerinckii* en un biorreactor CSTR operado a 35°C, usando como sustrato vinaza de tequila, obteniendo un rendimiento de 124 mL H₂/gSTV. Rambabu *et al.*, 2021, obtuvieron un rendimiento de 215 mL H₂/L utilizando esta especie en la fermentación de agua residual generada en la molienda de arroz bajo condiciones mesofílicas (37°C) en modalidad batch. Por lo que la presencia de estas dos especies en la reacción es un indicativo de una eficiente producción de bioH₂.

La especie de *Clostridium* que predominó a las 72 h en el RBL1 fue *C. lundense*. Si bien esta especie no es reportada como productora de bioH₂ como las anteriormente mencionadas, es estudiada por su capacidad de hidrolizar lípidos, por lo que podría estar involucrada en la etapa de hidrólisis de la FO (Cirne *et al.*, 2006). Al igual que todas las especies de este género, se encuentran en el suelo, intestino de mamíferos y rumen de bovinos. Son capaces de

esporular y crecen en condiciones mesofílicas a un pH de 5.5-7 (Cirne *et al.*, 2006; Wikoff *et al.*, 2009). Por otro lado, a este tiempo de muestreo se encontró la presencia de *Lactobacillus shenzhenensi*, representando un 20% del microbioma del RBL1 a las 72 h. Si bien, los miembros de la familia *Lactobacillus* no tienen la capacidad de esporular Zou *et al.*, 2013 tuvieron una gran presencia de estos microorganismos en el sistema al final de la FO, esto probablemente se deba a la característica granular del inóculo, que está formado por capas y, posiblemente le sirva de protección a algunas bacterias (Lirio María Reyna-Gómez, 2021). La presencia de este microorganismo aumentó de menos del 1% a las 24 h hasta un 20% a las 72 horas, repercutiendo en la producción de bioH₂, pues la presencia de *Lactobacillus* está asociada a la inhibición de la producción de bioH₂ debido a la competencia por el sustrato que generan con los microorganismos productores como aquellos del género *Clostridium*, sin embargo, la presencia de este microorganismo pudo coadyuvar en la remoción de materia orgánica, reflejándose en el mayor consumo de CHT a las 72 h (Dzulkarnain *et al.*, 2022).

La **figura 4.26** muestra la clasificación taxonómica y el microbioma presente en el RBL2 a nivel de filo al final de la reacción (72 h). Se obtuvo un 99% de bacterias del filo *Firmicutes* en este biorreactor, ligeramente por arriba del RBL1 a las 72 h, el 1 % restante no fue identificado.

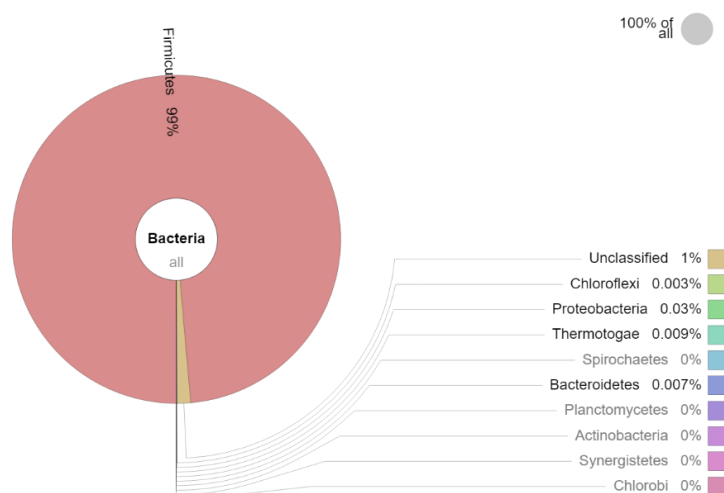


Figura 4.26. Clasificación taxonómica a nivel filo del microbioma del RBL2 a las 72 h de FO. (40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$).

A nivel de género, nuevamente se encontró una gran predominancia de *Clostridium*, con un 83% de presencia a las 72 h, siendo más abundantes que en el mismo tiempo en el RBL1, lo que indica una nula diferencia cuando el RCM es suministrado. Como se puede observar en la **figura 4.27**, la especie con mayor presencia fue *C. butyricum* con un 64%, seguido de *C. beijerinckii* con un 9%, *Clostridium* sp. con 8% y *C. oryzae* con apenas 1%. La presencia de *C. butyricum* impacta de manera positiva en la producción de bioH₂, pues en el RBL2 se obtuvo un mayor volumen de bioH₂ acumulado (450 mL), un 20% más que el RBL1, en el cual, a las 72 h, solo había un 9% de *C. Butyricum*. Aunado a esto, el RBL2 presentó un menor porcentaje de *Lactobacillus*, siendo tan solo 2% de *Lactobacillus shenzhenensis* y 2% de *Lactobacillus* sp.

Se identificó también la presencia de *Enterococcus gallinarum* en un 9%, Una bacteria del orden *Lactobacillales*, que al igual que *Lactobacillus*, inhibe la producción de bioH₂ por competencia del sustrato (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015; Dzulkarnain *et al.*, 2022), así mismo, gracias a sus características, puede propiciar la acumulación de ácido fórmico. Lo anterior se vio reflejado en la alta concentración de dicho metabolito, pues se detectó en una concentración de 12 mmol (**Figura 4.22**), concordando con Shin *et al.*, 2010 quienes asocian la acumulación de ácido fórmico con la presencia de microorganismos anaerobios facultativos.

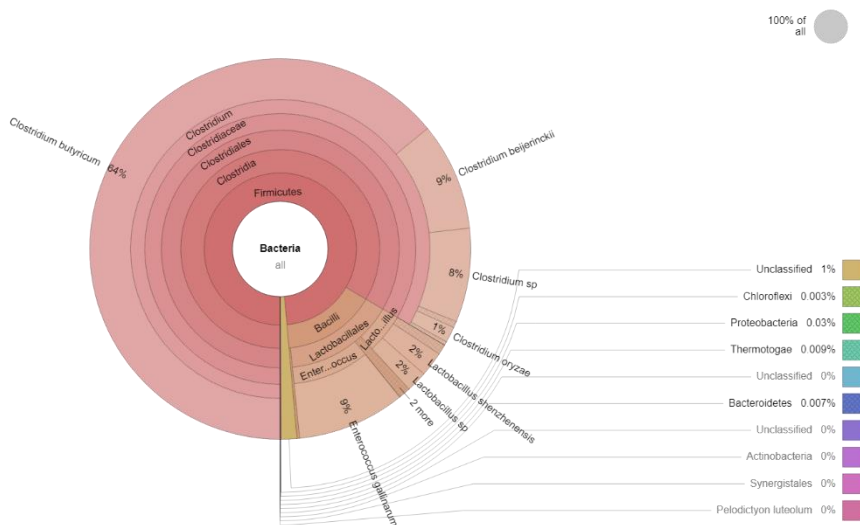


Figura 4.27. Clasificación taxonómica a nivel especie del microbioma del RBL2 a las 72 h de FO. (40 RPM, 35 ± 2°C, pH 5.50 ± 0.05).

Para el RBL3, a nivel filo, se observó, se igual manera, una predominancia del filo *Firmicutes* con un 95% al final de la reacción (60 h), como se observa en la **figura 4.28**. Sin embargo, el 3% no fue identificado, un 1% pertenecen al filo *Proteobacteria* y *Chloroflexi* representó el 0.3%.

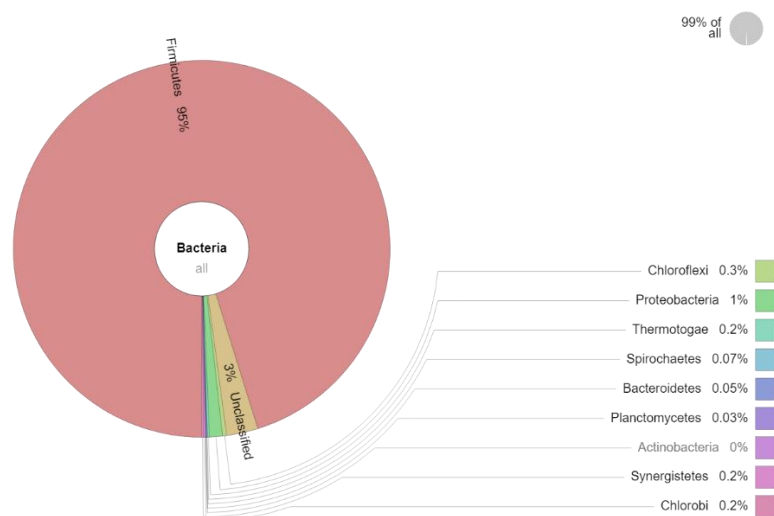


Figura 4.28. Clasificación taxonómica a nivel filo del microbioma del RBL3 a las 60 h de FO. (40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$).

El género *Clostridium*, al igual que en los otros dos biorreactores batch, fue predominante en el RBL3, con un 73% de presencia. Sin embargo, tal y como se observa en la **figura 4.29**, no se encontró un porcentaje alto de especies de *Clostridium* con alta eficiencia de producción de bioH_2 , pues tan solo se encontró un 1% de *C. butyricum* y 0.1% de *C. beijerinckii*. En su lugar, se encontró una amplia predominancia de *Clostridium frigoriphilum* con un 46% de las bacterias totales encontradas en el RBL3 a las 60 h, seguido de *Clostridium* sp con 15%, *Clostridium perfringens* con 4%, *Clostridium estertheticum* con 3% y *C. oryzae* con 1%.

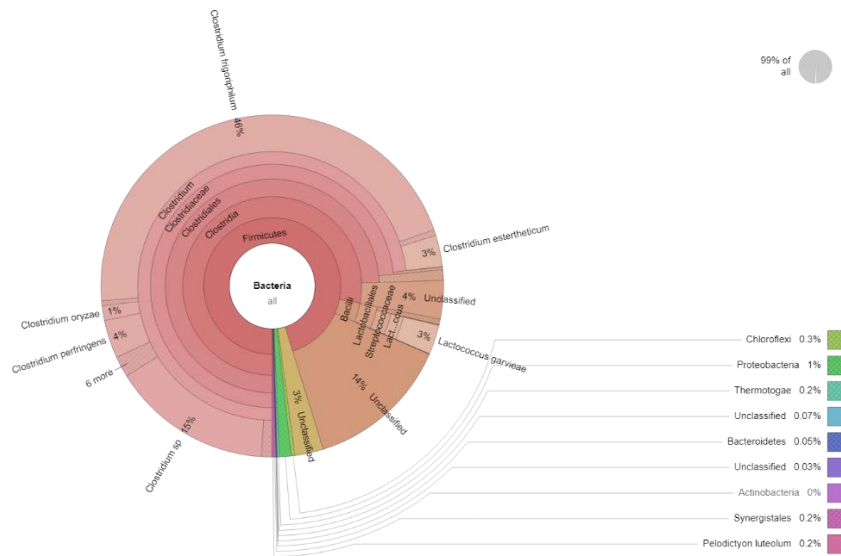


Figura 4.29. Clasificación taxonómica a nivel especie del microbioma del RBL3 a las 60 h de FO. (40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$).

De todas las especies de *Clostridium* encontradas a las 60 h del RBL3, solo *C. butyricum* está reportada como productora de bioH_2 , y tan solo tuvo una presencia del 1% (Bando *et al.*, 2013), por lo que la baja producción de bioH_2 en este biorreactor se podría asociar a la ausencia de más especies de *Clostridium* productoras de este gas. En su lugar, la especie predominante fue *C. frigoriphilum*, la cual, en conjunto con *C. estertheticum* (que tuvo una presencia del 3%), son reportadas como cepas tolerantes al frío, causantes de la descomposición de carne congelada empaquetada al vacío (Mang *et al.*, 2021). La presencia de estas especies podría ser atribuida a la naturaleza del ARR empleada como sustrato en la codigestión, pues se preparó una solución sintética a partir de carne molida empaquetada, emulando las características que el agua residual generada en los rastros (Barba *et al.*, 2018).

La baja producción de bioH_2 en el RBL3 también es atribuida a la presencia de CH_4 en todos los tiempos de muestreo. Si bien no se detectaron especies metanogénicas en el análisis genético, hubo un total del 3% de bacterias no identificadas a las 60 h, por lo que en ese porcentaje podrían estar ubicadas ciertas especies metanogénicas. Aunado a lo anterior, un total del 14% de bacterias del filo *Firmicutes* no fueron identificadas, por lo que dentro de este porcentaje podrían estar presentes múltiples especies que pudieron haber contribuido al consumo de materia orgánica a lo largo de la FO.

4.5. Operación de biorreactores continuos de 3 L.

Una vez analizados los resultados obtenidos en los biorreactores batch de 3 L, y con el objetivo de incrementar la producción de bioH₂, se montaron 2 biorreactores continuos con un volumen de trabajo de 3 L (RC1 y RC2) y TRH de 6 h. Para esta etapa experimental, se evaluó el efecto del modo de operación del reactor aunado a la agitación del medio en la producción de bioH₂. El RC1 fue operado con una agitación de 40 RPM, mientras que el RC2 se operó con una agitación de 80 RPM.

La operación de los biorreactores continuos de 3 L se llevó a cabo durante 20 ciclos para el RC1 y 18 ciclos para el RC2. Así mismo, se evaluaron los parámetros fisicoquímicos descritos con anterioridad, así como la composición del biogás generado en cada ciclo.

4.5.1. Producción de biogás y bioH₂

En la **figura 4.30** se muestra el volumen de biogás acumulado a lo largo del proceso de FO en los dos biorreactores continuos empleando el método de la bureta invertida descrita en la **figura 3.7** del **capítulo 3**.

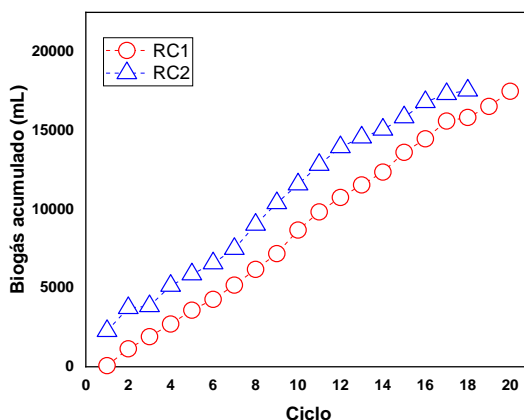


Figura 4.30. Volumen de biogás acumulado en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos (TRH 6 h, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT).

El volumen de biogás acumulado fue mayor en el RC2, alcanzando un total de 17,540 mL al final de la reacción (18 ciclos), valor superior al obtenido en el RC1, que obtuvo un volumen de biogás acumulado de 15,830 mL a los 18 ciclos y de 17,490 mL al final de la reacción (20 ciclos). A partir de los resultados anteriormente mencionados, se puede observar una mejora

del 10% en la producción de biogás a los 18 ciclos del proceso cuando se trabaja a 80 RPM. Este resultado coincide con lo reportado por Brindhadevi *et al.*, 2021 quienes optimizaron la producción de biogás duplicando las RPM de 40 a 80.

A partir de los análisis por CG-TCD de las muestras del RC1 y RC2, se reveló que los productos finales predominantes fueron bioH₂ (9-42%) y CO₂ (58-91%). Por su parte, el RC1, además de bioH₂ (9-21%) y CO₂ (78-91%), a partir del ciclo 15, se observó presencia de CH₄ en el intervalo de 2-30%. A partir de la descripción anterior, se puede observar en la **figura 4.31**, que la producción acumulativa de bioH₂ fue superior en el RC2, con un total de 2,314 mL al final de la reacción, en contraste con los 1,805 mL obtenidos en el RC1. Esto representa un incremento del 22% de producción del RC2 en contraste con el RC1, lo que evidencia un impacto positivo cuando se duplica la agitación de 40 a 80 RPM, concordando con lo reportado por Brindhadevi *et al.*, 2021 quienes optimizaron la producción de biogás y bioH₂ cuando operaron un biorreactor CSTR a 80 RPM. Lo anterior podría estar asociado a que al duplicar la agitación del medio se puede alterar el microbioma del biorreactor, pues para ciertas especies de bacterias consumidoras de bioH₂ esta agitación propicia un estrés ambiental y les impide proliferar (Dzulkarnain *et al.*, 2022).

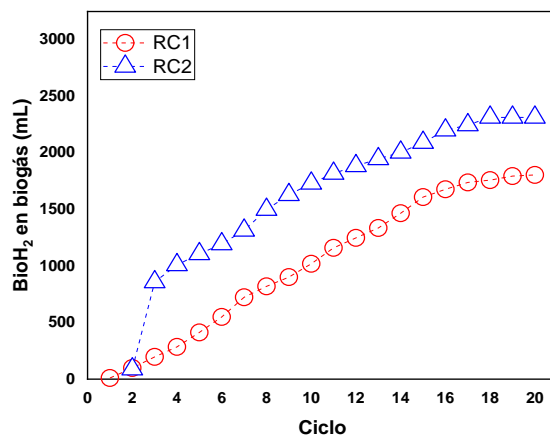


Figura 4.31. Volumen de bioH₂ acumulado en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos (TRH 6 h, 35 ± 2°C, pH 5.50 ± 0.05, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT).

Aunque el RC2 presentó el mayor volumen de bioH₂ acumulado al final de la reacción, el rendimiento de bioH₂ fue mayor en el RC1, pues, tal y como se observa en la **figura 4.32**, este biorreactor alcanzó valores máximos de hasta 223 mLH₂/gSTV en el ciclo 13, mientras que el pico máximo de rendimiento para el RC2 fue en el ciclo 3, con un valor de 139 mLH₂/gSTV. Sin embargo, es más que evidente la estabilidad en el rendimiento del RC2, puesto que este parámetro fue constante a lo largo del proceso de FO, y se podría asociar con una menor variación de la tasa de carga orgánica (OLR, por sus siglas en inglés) como se puede observar en la **figura 4.33**. El rendimiento promedio del RC1 fue de 70 ± 10 mLH₂/gSTV y para el RC2 fue de 41 ± 14 mLH₂/gSTV.

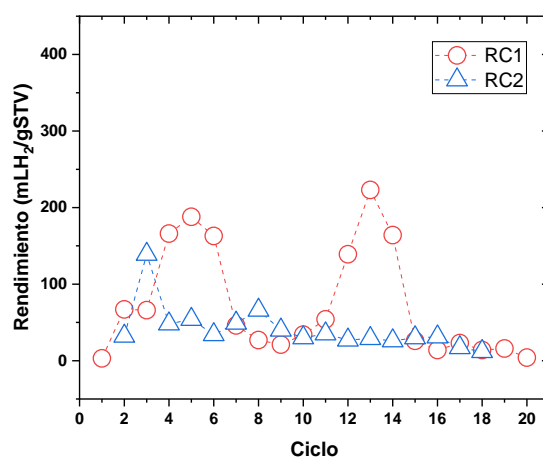


Figura 4.32. Rendimiento de bioH₂ en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos (TRH 6 h, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% inóculo tratado con CT).

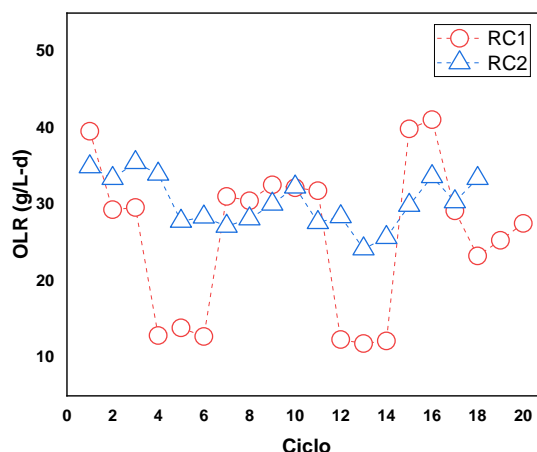


Figura 4.33. OLR en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos (TRH 6 h, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% inóculo tratado con CT).

La OLR indica la cantidad de materia orgánica que ingresa al biorreactor e impacta directamente en la producción de biogás (Behera & Varma, 2016; Won & Lau, 2011). Este parámetro ha sido reportado como un factor más que controlar en el proceso de FO, pues valores muy altos o bajos de OLR resultan adversos para la producción de bioH_2 . Mientras que los valores altos podrían causar una inhibición del crecimiento microbiano debido a una sobrecarga del sustrato, los valores más bajos incrementan la competencia por el sustrato, cambiando las rutas metabólicas de los microorganismos productores de bioH_2 (Del Pilar Anzola-Rojas *et al.*, 2015). La OLR fue más estable en el RC2, con valores que oscilaron de 24 a 35 gSTV/L-d , mientras que el RC1 presentó una mayor variación de 12 a 41 gSTV/L-d . Esto podría estar relacionado con el rendimiento de bioH_2 , pues, como se observa en las dos figuras anteriores, en el caso del RC1, se observó un mejor rendimiento de bioH_2 cuando la OLR fue más baja (ciclos 4, 5, 6, 12, 13 y 14) con una OLR de alrededor de 12 gSTV/L-d , concordando con lo reportado por Hafez *et al.*, 2010 quienes sugieren que la OLR indicada para la producción de bioH_2 es de alrededor de 4 a 7 gSTV/g-d . Las variaciones erráticas de la OLR en el RC1 pudieron haber repercutido negativamente en el volumen acumulado de bioH_2 de este biorreactor.

La productividad de bioH_2 se refiere a la velocidad de producción de dicho gas en el sistema (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015). Para este caso, como se observa en la **figura**

4.34, la productividad en ambos biorreactores continuos fue similar, sin embargo, fue ligeramente mayor en el RC2, teniendo un promedio de 7 ± 5 mLH₂/L-h, comparado con la productividad del RC1 que fue en promedio de 5 ± 3 mLH₂/L-h.

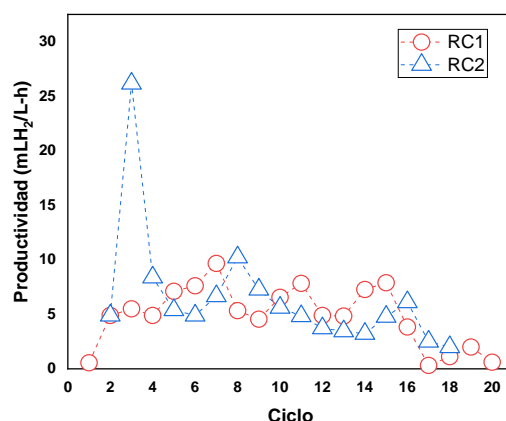


Figura 4.34. Productividad de bioH₂ en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos (TRH 6 h, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% inóculo tratado con CT).

Los resultados de rendimiento de los biorreactores continuos fueron inferiores a los biorreactores batch. Sin embargo, la producción de biogás, la acumulación de bioH₂ y la productividad fue mayor cuando la FO fue llevada a cabo en modo continuo, pues en ambos biorreactores continuos se obtuvieron más de 1800 mL de bioH₂ al final del proceso, resultando más eficiente cuando la agitación del medio fue de 80 RPM, pues como reporta Brindhadevi *et al.*, 2021, la agitación del medio influye de manera considerable en la producción de biogás y bioH₂, ya que un déficit o un exceso de agitación resultan perjudiciales para el proceso. Un estudio realizado por Garcia-Peña *et al.*, 2013 presentó un rendimiento de 60 mLH₂/gSTV y una productividad de 1.58 mLH₂/L-h utilizando residuos de frutas y vegetales como sustrato utilizando un inóculo con la misma naturaleza a la del presente trabajo (LGA tratado con CT). Por otro lado, Reyna-Gómez, 2021 reportó un rendimiento de 25 mLH₂/gSTV y una productividad de 2.6 mLH₂/L-h utilizando una codigestión de cáscara de frutas y lodos primarios como sustrato usando LGA con CT como inóculo. Los resultados obtenidos en el presente trabajo son ligeramente superiores a los resultados de los anteriores trabajos. Sin embargo, se han reportado rendimientos de 91

mLH₂/gDQO y productividades de 102 mLH₂/L-h utilizando una codigestión de nejayote con vinaza de tequila operando biorreactores batch con características similares a las del presente trabajo (35°C, pH 5.50) (García-Depraect *et al.*, 2017).

4.5.2. Monitoreo de parámetros fisicoquímicos y consumo de sustratos

Al igual que con los microrreactores y biorreactores batch, en los biorreactores continuos también fueron monitoreados el pH, CHT, DQO, ST y STV a lo largo de la reacción en cada ciclo.

En la **figura 4.35** se presentan los resultados de pH durante la operación continua de los biorreactores RC1 y RC2. Al igual que en los biorreactores batch, se utilizó el software del biorreactor Biostat A para controlar este parámetro, teniendo valores controlados de 5.50 ± 0.05 . En el caso del RC1 se observaron los valores más bajos de pH en los ciclos 2, 9 y 18, sin embargo, nunca se salió del intervalo, por lo que dichas variaciones no propiciaron cambios importantes en la producción de bioH₂.

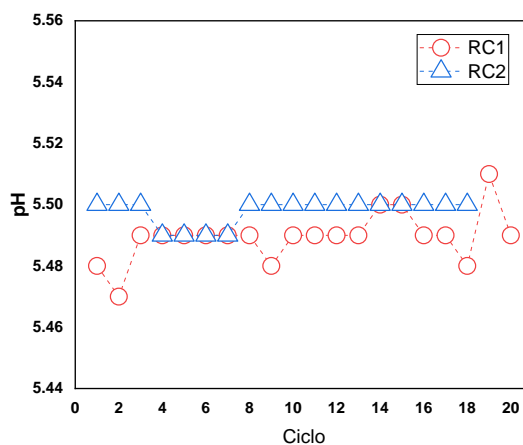


Figura 4.35. Valor de pH en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos (TRH 6 h, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT).

En la **figura 4.36** se presentan los resultados de consumo de CHT durante la operación continua de los biorreactores RC1 y RC2. Se observó un comportamiento similar entre ambos biorreactores continuos, presentando un intervalo de 40% de consumo de CHT en los primeros ciclos y posterior incremento de consumo a lo largo de los siguientes ciclos,

obteniendo un consumo final del 77% y del 65% para el RC1 y RC2, respectivamente. Estos valores representan un consumo más alto de CHT comparado con lo obtenido en los biorreactores batch cuyo inóculo se trató con CT (RBL1 y RBL2), en donde se observó una remoción de CHT del 37% y 23% respectivamente, al final de la reacción, lo que nos indica que operar el biorreactor de manera continua propicia el consumo de carbohidratos totales, duplicando el porcentaje de remoción en contraste con la operación batch.

Comparado con otros trabajos, Méndez, 2021 reportó una remoción de CHT del 96% después de 36 h de FO utilizando una codigestión de suero de queso con agua residual de la industria cervecera y LGA con CT como inóculo. El alto porcentaje de remoción puede deberse a que el sustrato que se utilizó como fuente de carbohidratos (suero de queso) es rico en lactosa, un disacárido conformado por una molécula de glucosa y una de galactosa (Grenov *et al.*, 2016) pues, al no ser un azúcar complejo, las bacterias pueden fermentar dicha molécula más fácilmente. Sin embargo, un estudio en un biorreactor UASB realizado por Del Angel-Acosta *et al.*, 2021 empleando una codigestión de nejayote y agua residual de cervecería y LGA con CT como inóculo, reportaron una remoción de CHT del 68% después de 122 h concordando con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

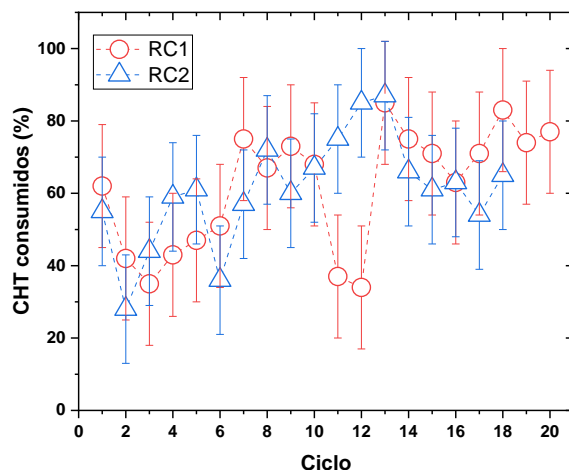


Figura 4.36. Consumo de CHT en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos (TRH 6 h, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT).

En la **figura 4.37** se puede observar la evolución del porcentaje de remoción de DQO durante la operación continua de los biorreactores RC1 y RC2. Al igual que en los resultados de CHT, nuevamente se aprecia un comportamiento similar en ambos biorreactores continuos, con un porcentaje de remoción promedio en el intervalo de $37-44 \pm 9\%$, siendo dichos porcentajes de remoción de DQO ligeramente superiores al porcentaje de DQO removido obtenido en los biorreactores batch de la sección 4.4.2, que fue en promedio 32%, 28% y 30% para el RBL1, RBL2 y RBL3, respectivamente. A partir del análisis de literatura, Del Angel-Acosta *et al.*, 2021 obtuvieron una remoción de apenas el 17% de DQO utilizando una codigestión de nejayote y agua residual de la industria cervecera en un sistema cuyo pH inicial fue de 5.8 a 35°C utilizando LGA con CT como inóculo. Mientras que, García-Depraect *et al.*, 2017 reportaron una remoción de DQO del 23% después de 140 h de FO utilizando una codigestión de nejayote con vinaza de tequila bajo condiciones similares a las del presente estudio (35°C, pH 5.50, LGA con CT como inóculo). La remoción de DQO en el presente trabajo fue mayor, llegando alrededor de 44% en el RC2, esto se podría deber a que se utilizó un ajuste de la relación de C/N en el presente trabajo y, a diferencia de la literatura anteriormente citada, no se trabajó con relaciones de sustratos. Esto demuestra que la remoción de DQO no solo depende de la codigestión de sustratos, sino de la correcta relación de nutrientes que puede propiciarse ajustando el balance de la relación C/N (Arantes *et al.*, 2020).

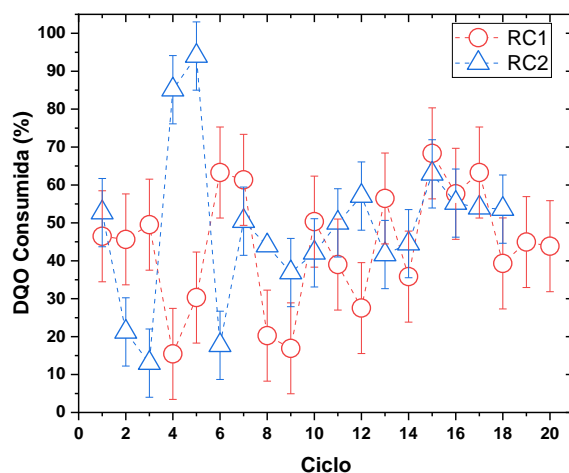


Figura 4.37. Consumo de DQO en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos (TRH 6 h, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT).

La **figura 4.38** ilustra el consumo de ST y STV en los diferentes ciclos de los biorreactores continuos. En cuanto a los ST, el RC1 y RC2 tuvieron consumos similares que oscilaron del 10 al 45%, siguiendo con el patrón observado en la remoción de DQO y CHT, donde el consumo es mayor en los sistemas continuos que en los batch, posiblemente debido a una mejor adaptación de los microorganismos al sistema (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015), lo anterior se vio reflejado en la producción de biogás, pues fue mayor en los sistemas continuos que en los batch. Lo mismo se observó con los STV, en donde el RC1 y RC2 tuvieron una remoción del 13 al 54% a lo largo de la FO, valores considerablemente más altos que en los biorreactores batch, en donde, cuando se empleó inóculo tratado con CT, se removió un máximo del 30% de STV (a las 48 h del RBL1). Comparado con la literatura, si bien no existen reportes previos del consumo de ST y STV en la codigestión NEJ-ARR, se obtuvieron valores muy similares a los reportados en el trabajo de Méndez, 2021 donde la remoción promedio fue de 20% y 40% de ST y STV, respectivamente, utilizando una codigestión de suero de queso y agua residual de la industria cervecera con LGA tratado con CT como inóculo en un sistema continuo operado a un TRH de 9 horas bajo condiciones similares a las del presente trabajo (35°C , pH inicial de 5.50).

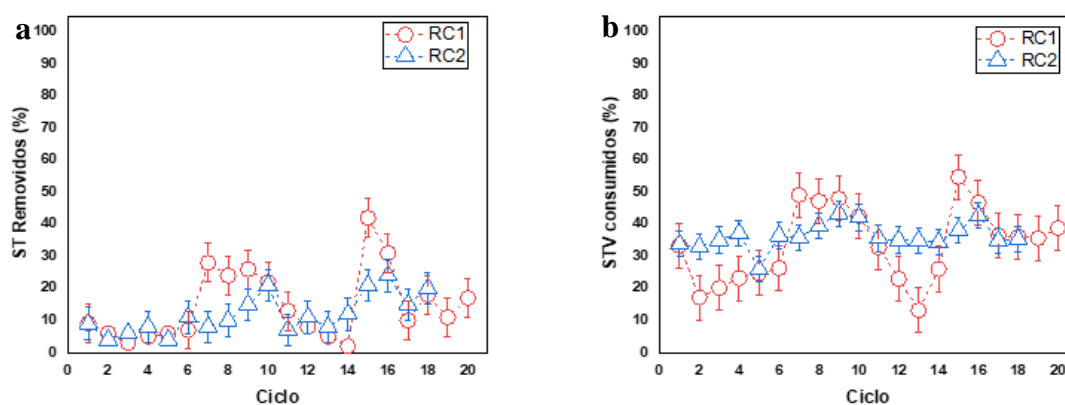


Figura 4.38. a) Consumo de ST en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en los biorreactores continuos; b) Consumo de STV en los diferentes ciclos a lo largo de la FO en

los biorreactores continuos (TRH 6 h, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$, 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT).

4.5.3. Producción de ácidos grasos volátiles (AGVs)

Tal como en los experimentos pasados (microrreactores y biorreactores batch), se hizo uso de la CG-FID para identificar los AGVs producidos a lo largo de la reacción. La **figura 4.39** muestra la evolución de los subproductos generados en el RC1 durante la operación continua en los ciclos 7, 10 y 14. En este caso, nuevamente se observa una predominancia del ácido acético (11-18 mmol), seguido de ácido fórmico (7-11 mmol), ácido propiónico (3-8 mmol) y, finalmente, trazas de ácido butírico. Remarcando la predominancia del ácido acético en los tres ciclos muestreados. Sin embargo, en el ciclo 10 se encontró una alta concentración de ácido propiónico de alrededor de 8 mmol, esto se vio reflejado negativamente en la producción de bioH_2 , pues en dicho ciclo se obtuvo la composición más baja, con tan solo un 9% de bioH_2 presente en el biogás generado, aunado a lo anterior, en este ciclo se obtuvo la mayor acumulación de AGVs en los tres ciclos muestreados, este factor podría también contribuir a la baja producción de bioH_2 observada en este ciclo (Liang *et al.*, 2020). Lo anterior hace evidencia a la presencia de la fermentación tipo propionato descrita en el punto 4.3.1, influyendo de manera negativa en la producción de bioH_2 pues es ampliamente reportado que dicha fermentación consume el hidrógeno producido durante la FO (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015). A diferencia de los biorreactores batch de 3 L, en la operación continua de los biorreactores RC1 y RC2 hubo una producción casi nula de ácido butírico y una alta concentración de ácido propiónico. Lo anterior posiblemente se deba al modo de operación del biorreactor, pues a diferencia de la operación batch, en la operación continua se introducía sustrato nuevo constantemente (a un TRH de 6 h) lo que podría propiciar el aumento en la concentración de oxígeno disuelto ocasionando una microaeración del medio alterando el microbioma del sistema (Dzulkarnain *et al.*, 2022; J. Wang & Yin, 2019).

Esta tendencia fue reportada por Cruz-López *et al.*, 2022 quienes obtuvieron una predominancia de ácido acético en un biorreactor continuo operado a un HRT de 9 horas utilizando una codigestión de suero de queso con agua residual de cervecería. Sin embargo, en dicho estudio, en el ciclo 10 se observó la concentración más alta de ácido propiónico con

valores de 550 mg/L. Pese a lo anterior, el ácido acético predominó en los tres ciclos muestreados, por lo que la producción de bioH₂ fue continua.

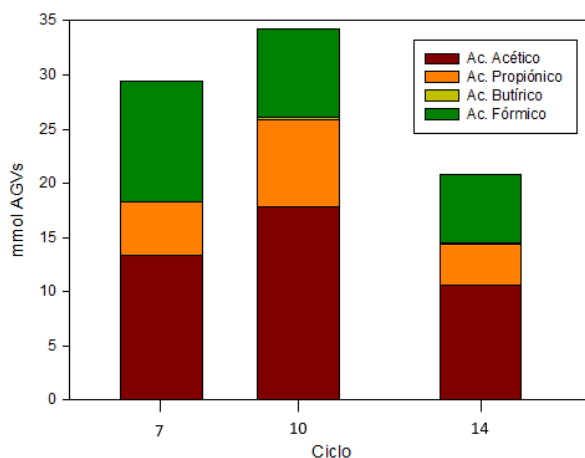


Figura 4.39. Concentración en mmol de AGVs en diferentes ciclos a lo largo de la FO en el RC1. (TRH 6 h, 40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$ 10% V/V RCM, 10% V/V inóculo tratado con CT).

En la **figura 4.40** muestra la producción de AGVs en el RC2 en los ciclos 2, 8, 13, 16 y 18. Para este experimento, nuevamente se observa una clara predominancia del ácido acético (11-16 mmol), seguido de ácido fórmico (7-9 mmol), ácido propiónico (4-5 mmol) y, finalmente, trazas de ácido butírico. Al ser el ácido acético el principal subproducto, la producción de bioH₂ fue constante (Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, 2015).

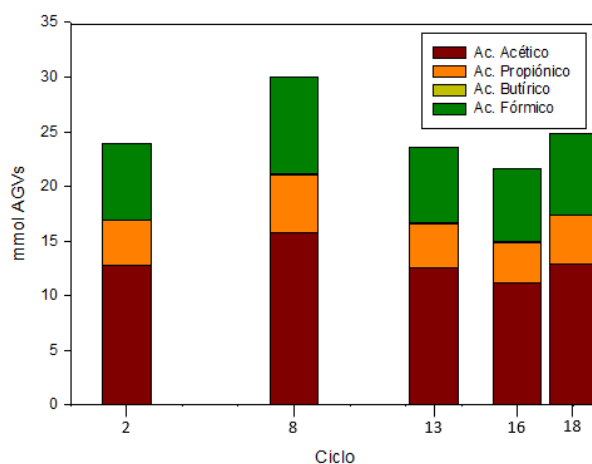


Figura 4.40. Concentración en mmol de AGVs en diferentes ciclos a lo largo de la FO en el RC2. (TRH 6 h, 80 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$).

Comparando la producción de AGVs en los biorreactores de 3 L operados de manera batch y continua se puede observar que en los biorreactores batch tratados con CT (RBL1 y RBL2) la producción de ácido acético fue mayor que en los dos biorreactores continuos (RC1 y RC2) (15-27 mmol vs 11-18 mmol, respectivamente), lo que se vio reflejado en la cantidad de bioH₂ en biogás, pues en los biorreactores batch osciló de 20-66% en contraste con los biorreactores continuos que fue de 9-42%. Sin embargo, la naturaleza continua del RC1 y RC2 permitió una mejor producción de bioH₂ pues esta fue constante y, la cantidad de biogás generada fue mayor que en los sistemas batch. Otra diferencia entre ambos sistemas fue la cantidad de ácido propiónico, en donde fue ligeramente mayor en los sistemas continuos (3-8 mmol) que en los sistemas batch (1-3 mmol) repercutiendo nuevamente de manera negativa en la cantidad de bioH₂ en biogás. En cuanto a la producción de ácido butírico y ácido fórmico, los dos modos de operación resultaron ser similares. Pese lo anterior, se logró una eficiente producción de bioH₂ en ambos sistemas, mejorando sustancialmente cuando el biorreactor fue operado de manera continua, pues esto permitió una mayor generación de biogás y, por ende, de bioH₂.

4.5.4. Análisis de la diversidad microbiana de los biorreactores continuos de 3 L

Con el objetivo de conocer el microbioma presente en ambos biorreactores continuos, se realizó la extracción de ácidos nucleicos de muestras tomadas a diferentes ciclos para posteriormente ser secuenciadas utilizando la plataforma Miseq Illumina, como se efectuó con las muestras de los biorreactores batch.

Para el RC1 se analizó el microbioma de los ciclos 7 y 14, debido a que en el ciclo 7 hubo uno de los más altos consumos de CHT en todos los ciclos de la reacción (75%), y el ciclo 14 que fue el ciclo donde mayor producción de bioH₂ hubo (17% de bioH₂ en biogás, 131 mL de bioH₂ producido en el ciclo). Por otro lado, el microbioma del RC2 fue analizado en los ciclos 8, 13 y 16, ya que en el ciclo 8 hubo un mayor consumo de CHT (72%) aunado de la mayor producción de bioH₂ (13% en biogás, 184 mL producidos en el ciclo), el ciclo 13 fue en donde mayor consumo de CHT hubo (87%) y el ciclo 16 se obtuvo una de las mejores producciones de bioH₂ (12% de presencia en biogás, 110 mL generados en el ciclo).

La **figura 4.41** muestra el microbioma a nivel filo presente en el RC1 en el ciclo 7 y 14. Respectivamente, se identificó el 93 y el 92% de las secuencias, y, al igual que en los

biorreactores batch, el filo *Firmicutes* fue predominante en ambos ciclos de la reacción llevada cabo en el RC1 con valores del 90-91%.

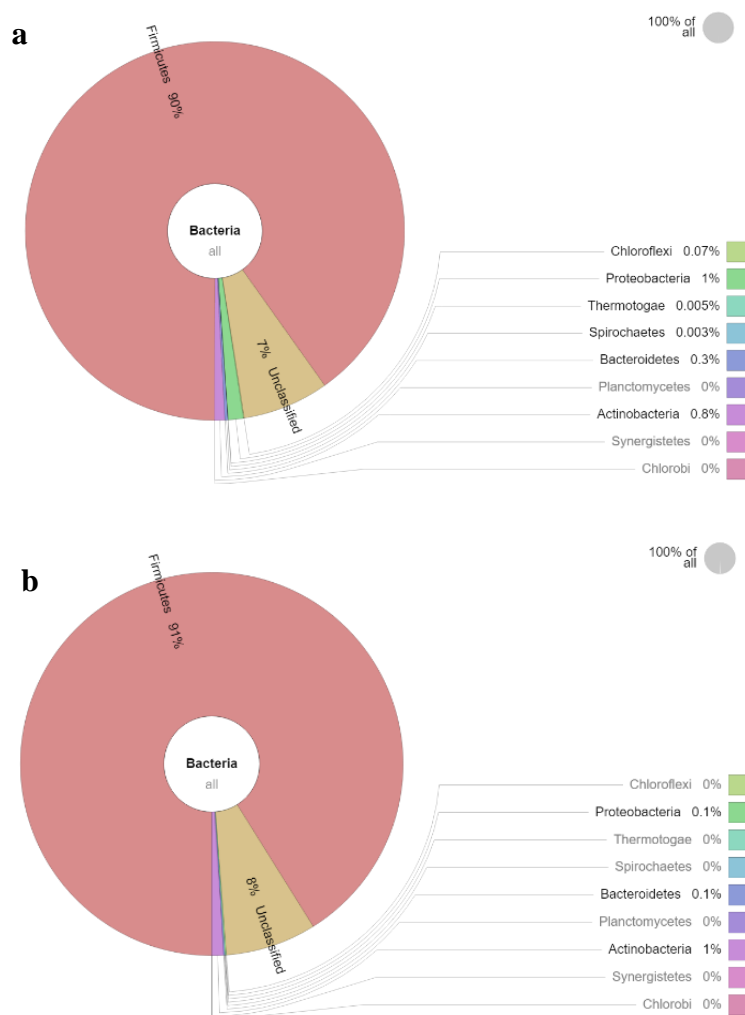


Figura 4.41. Clasificación taxonómica a nivel filo del microbioma del RC1. a) ciclo 7 de la FO; b) ciclo 14 de la FO. (TRH 6 h, 40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$).

En el ciclo 7 del RC1 se observó un 1% de presencia del filo *Proteobacteria*, este filo, como se mencionó con anterioridad, se encarga de a hidrólisis de azúcares y en la etapa de acidogénesis, convirtiendo azúcares en AGVs (Dzulkarnain *et al.*, 2022; Lirio María Reyna-Gómez, 2021). En el ciclo 14, hubo una presencia del 1% del filo *Actinobacteria*, el cual no había tenido presencia en los biorreactores batch y, en el ciclo 7, solo había aparecido en un 0.8%. En el ciclo 14, la especie *Pseudoclavibacter soli*, fue la predominante del filo *Actinobacteria*, con una presencia del 30% de todas las bacterias de este filo. *P. soli* es

reportada por su capacidad hidrolítica, por lo que puede contribuir en la primera etapa de la FO (Kim & Jung, 2009).

En la **figura 4.42** se muestra la diversidad microbiana a nivel de especie en el RC1 en el ciclo 7 y 14. Como se puede observar, hubo una predominancia del género *Clostridium* del 59% y 62%, respectivamente. En el ciclo 7 se observa un 47% de *Clostridium* sp seguido de un 5% de *C. frigidophilum*, 4% de *C. oryzae*, 1% de *C. butyricum*, 1% de *C. beijerinckii* y 1% de *Clostridium carboxidivorans*. Esta última especie de *Clostridium* no había sido identificada previamente en los otros biorreactores, además, es considerada como una bacteria acetogénica, por lo que participa en la tercera etapa de la FO. Su metabolismo propicia la formación de acetato, etanol, butirato y butanol (Liou *et al.*, 2005). Gracias a dichas características se le considera como una bacteria productora de bioH₂, aunque no con las eficiencias de *C. butyricum*, *C. acetobutyricum* y *C. beijerinckii* (Harrison, 2011). En cuanto al ciclo 14, Se obtuvo una menor diversidad en las especies de *Clostridium*, encontrándose solamente *Clostridium* sp y *C. oryzae* en un 97 y 3%, respectivamente. Sin embargo, la mayor proporción tanto del género *Clostridium* dentro de todos los microorganismos identificados, como de *Clostridium* sp dentro de los microorganismos pertenecientes a este género, pudo haber propiciado una mayor producción de bioH₂, debido a que en este ciclo se obtuvo la mayor producción de dicho gas, con una presencia del 17% en el biogás generado y una producción de 131 mL en este ciclo.

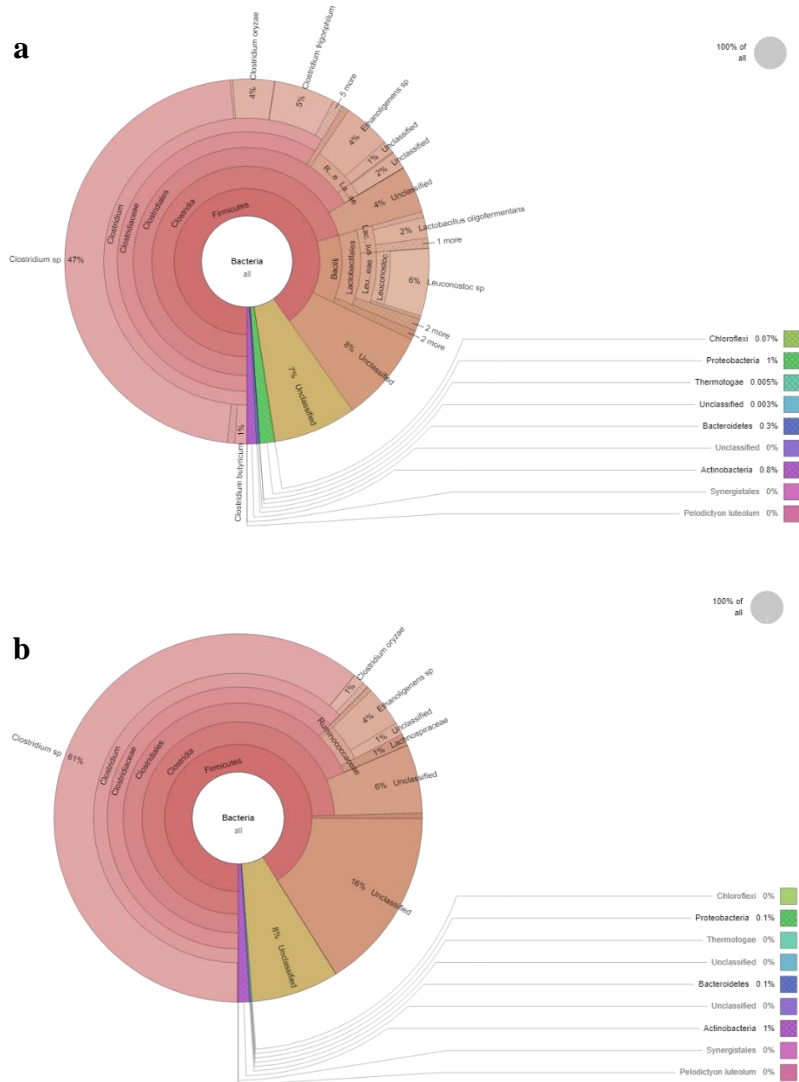


Figura 4.42. Clasificación taxonómica a nivel especie del microbioma del RC1. a) ciclo 7 de la FO; b) ciclo 14 de la FO. (TRH 6 h, 40 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$).

En el ciclo 7 hubo un total de 5% de bacterias de la familia *Ruminococcaceae*, en donde un 80% de las bacterias pertenecientes a esta familia identificada, pertenece a la especie *Ethanoligenens sp.* Esta especie, al igual que las demás especies pertenecientes a su género, son frecuentemente reportadas como productoras de bioH_2 (Dzulkarnain *et al.*, 2022) con una producción máxima de $2.6 \text{ molH}_2/\text{mol}$ de sustrato (Behera & Varma, 2016), además, tienen una gran capacidad hidrolítica, lo cual incrementa la eficiencia en cuanto a la remoción de CHT, concordando con el alto consumo de dichas moléculas en este ciclo (Dzulkarnain *et al.*, 2022). Además, se identificó un 11% de microorganismos totales pertenecientes al

orden *Lactobacillales*, de este orden, 59% correspondía a la familia *Leuconostocaceae*, siendo *Leuconostoc* sp. la especie predominante de esta familia. Otra familia predominante de este orden fue *Lactobacillaceae*, con una gran predominancia de las especies *Lactobacillus oligofermentans* y *Lactobacillus casei*, con una presencia del 17 y 8% de la familia, respectivamente. La presencia de estos microorganismos no es favorable para la producción de bioH₂, pues inhiben la producción de este gas gracias a la competencia por el sustrato con las bacterias productoras de bioH₂ (Dzulkarnain *et al.*, 2022). Sin embargo, los microorganismos del orden *Lactobacillales* son ampliamente reportados como microorganismos encargados del metabolismo de carbohidratos, gracias a las enzimas que estos sintetizan como la fructoquinasa, lactato deshidrogenasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Mazareli *et al.*, 2020). Lo anterior coincide con la alta concentración de ácido fórmico presente en el biorreactor en el ciclo 7, pues los microorganismos del género *Lactobacillus*, al ser anaerobios facultativos, son ampliamente reportados como productores de dicho metabolito (Shin *et al.*, 2010; Q. Zhang *et al.*, 2020).

A diferencia del ciclo 7, en el ciclo 14, no hubo presencia de microorganismos del orden *Lactobacillales*, solo hubo un 62% de microorganismos de la familia *Clostridiaceae* y un 5% de la familia *Ruminococcaceae*, el resto de bacterias no lograron ser identificadas. La ausencia de *Lactobacillales* en este ciclo se vio reflejado en la producción de bioH₂, siendo el ciclo donde más bioH₂ se produjo y en la generación de ácido fórmico, pues en dicho ciclo la concentración de este metabolito fue menor. Aunado a esto, pese a que la diversidad de *Clostridium* fue menor en este ciclo, hubo una mayor presencia del género.

La **figura 4.43** muestra la diversidad microbiana presente en el RC2 en los ciclos 8, 13 y 16. El filo *Firmicutes* fue el predominante en los 3 ciclos muestreados, con una presencia del 91%, 89% y 95%, respectivamente. En el ciclo 8 hubo un 8% de bacterias sin identificar, en el ciclo 13 un 9% y en el ciclo 16 un 3% de bacterias sin identificar. Así mismo en los tres ciclos se observó una ligera presencia de bacterias del filo *Proteobacteria*, con una presencia del 0.3-0.9%, concordando con los resultados obtenidos en el RC1 y en los biorreactores batch.



Figura 4.43. Clasificación taxonómica a nivel filo del microbioma del RC2. a) ciclo 8 de la FO; b) ciclo 13 de la FO; c) ciclo 16 de la FO (TRH 6 h, 80 RPM, $35 \pm 2^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.50 \pm 0.05$).

La diversidad microbiana del RC2 a nivel de especie se muestra en la **figura 4.44**, como se puede apreciar, en los 3 ciclos de muestreo hubo un gran porcentaje de bacterias del filo *Firmicutes* sin ser identificadas (42-55%), además de un considerable porcentaje de bacterias sin identificar (3-9%). En el ciclo 8 se obtuvo la mayor cantidad y diversidad de especies del género *Clostridium*, pues este género representó un 31% del total de bacterias identificadas, con un 80% de *Clostridium* sp, seguido de *C. beijerinckii* con un 11%, 5% de *C. oryzae*, 1% de *C. carboxidivorans* y tan solo un 0.8% de *C. butyricum*. Para el ciclo 13, la presencia de *Clostridium* en el RC2 disminuyó al 24%, además, la diversidad de especies de este género también se vio disminuida, pues solo se logró detectar *C. oryzae* en un 18% y *C. beijerinckii* en un 4% con una presencia de *Clostridium* sp del 78%. Estas especies siguieron presentes hasta el ciclo 16, correspondiente al último muestreo del microbioma. Sin embargo, la

presencia del género bajó hasta el 21% de todos los géneros de bacterias identificados. En este ciclo se encontró un 94% de *Clostridium* sp, 5% de *C. oryzae* y solo un 0.8% de *C. beijerinckii*.

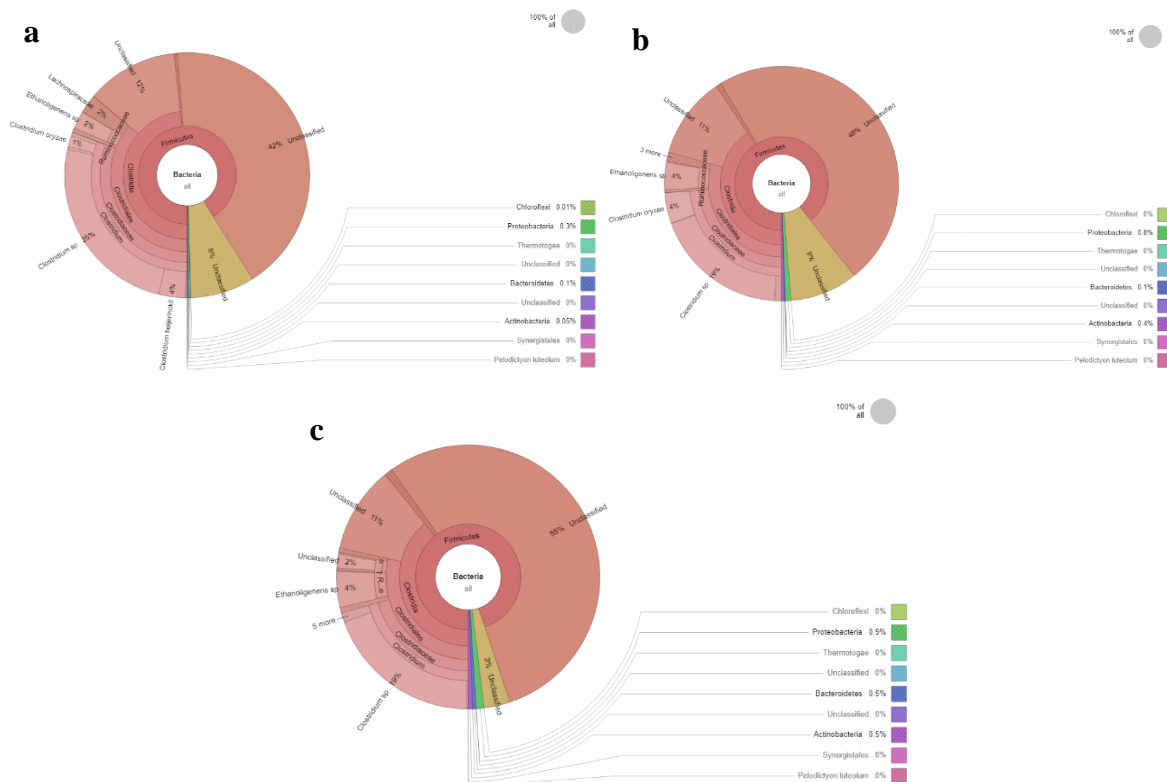


Figura 4.44. Clasificación taxonómica a nivel especie del microbioma del RC2. a) ciclo 8 de la FO; b) ciclo 13 de la FO; c) ciclo 16 de la FO (TRH 6 h, 80 RPM, 35 ± 2°C, pH 5.50 ± 0.05).

En el ciclo 8 se encontró la presencia de la familia *Ruminococcaceae* en un 2%, siendo *Ethanoligenens* sp la especie predominante de esta familia, siendo únicamente encontrada en los biorreactores operados de manera continua. Además, en este ciclo se tuvo la presencia de la familia *Lachnospiraceae* en un 2%. Los microorganismos pertenecientes a esta familia son anaerobios obligados y capaces de formar esporas, así mismo, tienen la capacidad de fermentar polisacáridos a ácidos grasos como butirato y acetato, además de etanol (Boutard *et al.*, 2014). Las especies de esta familia encontradas en el ciclo 8 del RC2 fueron *Syntrophococcus* sp, representando un 52% de la familia, *Lachoclostridium* con un 3% y un 45% de microorganismos de esta familia que no pudieron ser identificados. Los

microorganismos del género *Syntrophococcus* son anaerobios estrictos, y tienen la capacidad de hidrolizar compuestos complejos como lignina, ya que actúan como catalizadores para la degradación de sustratos en conjunto con las bacterias fermentativas (Valdez-Vazquez *et al.*, 2017). La presencia de este género podría explicar el alto consumo de CHT que hubo en este ciclo.

Para el ciclo 13 se incrementó la presencia de la familia *Ruminococcaceae* a un 4% de todas las bacterias identificadas, siendo nuevamente *Ethanoligenens* el género predominante de esta familia, coadyuvando a la degradación de CHT, que para este ciclo fue la mayor reportada en todo el proceso de FO del RC2 con un 87% de CHT degradados.

Por último, en el ciclo 16 se incrementó a un 5% la presencia de la familia *Ruminococcaceae*. Además, la familia *Lachnospiraceae* volvió a aparecer en un 2% del total de bacterias identificadas. Para este ciclo, además de *Lachoclostridium* con un 10% de presencia de los microorganismos correspondientes a la familia *Lachnospiraceae*, también hubo presencia de *Clostridium saccharolyticum* en un 6% del total de la familia. *C. saccharolyticum* es reportada por encontrarse en muestras de lodo granular anaerobio, además de ser un microorganismo productor de bioH₂ como la gran mayoría de las bacterias del género *Clostridium*, siendo este gas uno de los productos generados en la fermentación de sustratos, en conjunto con CO₂, ácido acético y etanol (Murray *et al.*, 1982). La presencia de esta última especie solo logró ser identificada en este ciclo del RC2, por lo que pudo haber propiciado una mayor producción de bioH₂ en conjunto con *Clostridium sp*, *C. oryzae* y *C. beijerinckii* identificadas, siendo este ciclo uno de los más eficientes en cuanto a la producción de bioH₂.

CAPÍTULO 5

Conclusiones

Con base en lo observado en los experimentos realizados, se concluye que es posible la producción de bioH₂ a partir de la codigestión de NEJ-ARR a través del proceso de FO utilizando consorcios microbianos como inóculo.

El pretratamiento por sonoquímica de los sustratos resultó ser eficiente, incrementando en un 58% aproximadamente el contenido de azúcares reductores, favoreciendo de esta manera, la fermentación de azúcares simples.

La producción de bioH₂ se vio favorecida cuando se llevó a cabo el proceso de FO a una relación C/N 30 de los sustratos, empleando CT como método de pretratamiento del inóculo, puesto que, cuando se utilizó radiación UV como pretratamiento del inóculo, hubo presencia de metano, impactando negativamente en la producción de bioH₂.

El escalamiento a 3L del proceso fue posible utilizando un biorreactor Biostat A marca Sartorius Stedim Biotech, replicando las condiciones del grupo de microrreactores más eficientes en la producción de bioH₂ (C/N 30 CT), teniendo un rendimiento máximo de 196 mLH₂/gSTV con un volumen acumulativo de 450 mL de bioH₂ en un sistema batch.

La adición del medio RCM tuvo un impacto positivo solamente en las primeras 24 h de la FO en la producción de bioH₂ en los biorreactores batch, pues el RBL2 (biorreactor sin RCM) tuvo una mejor producción y rendimiento al final del proceso (72 h).

La operación continua del biorreactor resultó ser la más eficiente en cuanto a la producción de bioH₂ y consumo de materia orgánica, pues cuando el biorreactor se operó de esta manera, se obtuvo un volumen máximo de bioH₂ acumulado de 2314 mL, una remoción máxima de CHT del 87% y una remoción de DQO de hasta el 94%.

Los AGVs generados a lo largo del proceso en los sistemas batch y continuos difirieron, ya que cuando el biorreactor se operó en modo batch, hubo una mayor acumulación de ácido acético (15-27 mmol) en contraste con los 11-18 mmol obtenidos en los sistemas continuos. Así mismo, en los sistemas continuos hubo una mayor presencia de ácido propiónico (3-8 mmol) en contraste con los biorreactores batch cuya concentración de ácido propiónico osciló de 1-3 mmol. Lo anterior se vio reflejado en la composición de bioH₂ presente en biogás, que fue superior en los sistemas batch (20-66%). Sin embargo, pese a la menor presencia del gas

deseado en los biorreactores RC1 y RC2 (9-42%), su naturaleza continua permitió una mayor producción acumulativa de biogás y, por consiguiente, de bioH₂, haciendo más atractiva la operación continua del biorreactor.

Se concluye que la agitación del medio tiene un impacto positivo en la producción de bioH₂, pues en el RC2 se obtuvo aproximadamente 600 mL más que en el RC1, incrementando la agitación de 40 RPM a 80 RPM.

La proliferación de microorganismos productores de bioH₂ como aquellos del género *Clostridium* (21-87% del total de microorganismos) fue posible mediante el control de parámetros como temperatura, relación C/N, pH, agitación, TRH, método de pretratamiento del inóculo y manteniendo las condiciones anaerobias del biorreactor. Encontrándose una gran predominancia de las especies *C. butyricum*, *C. beijerinckii* y *C. oryzae* las cuales son ampliamente reportadas como eficientes productoras de bioH₂, viéndose una relación entre su porcentaje de presencia con la producción de bioH₂, pues, cuando dichas especies se encontraron en mayor cantidad, mayor fue la producción de bioH₂.

5.1. Recomendaciones

Se recomienda buscar estrategias con el objetivo de que las especies de *Clostridium* con alta eficiencia en la producción de bioH₂, como *C. butyricum*, *C. beijerinckii*, *C. oryzae* y *C. acetobutyricum* tengan gran prevalencia durante todo el proceso de FO en sistemas continuos, para así asegurar una robustez del proceso, obteniendo grandes cantidades de bioH₂ de manera continua.

Así mismo, se recomienda realizar una aclimatación previa del inóculo, alimentándolo continuamente con la codigestión a ser empleada con el objetivo de adaptar a los microorganismos a dicha fuente de nutrientes y, de esta manera, propiciar un crecimiento más rápido en el sistema.

Por último, se recomienda el uso de herramientas de ingeniería genética con el objetivo de realizar una transgénesis del gen *hydA* de *Clostridium* y transferirlos a especies de fácil crecimiento como *Escherichia coli*, para de esta manera hacer más atractivo el proceso a escala industrial.

5.2. Productos obtenidos



5.3.Referencias bibliográficas

- A. Demirbas. (2002). Fuel Properties of Hydrogen, Liquefied Petroleum Gas (LPG), and Compressed Natural Gas (CNG) for Transportation. *Energy Sources*, 24(7), 601–610. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/00908312.2002.11877434>
- Abas, N., Kalair, A., & Khan, N. (2015). Review of fossil fuels and future energy technologies. *Futures*, 69, 31–49. <https://doi.org/10.1016/j.futures.2015.03.003>
- Abubackar, H. N., Keskin, T., Arslan, K., Vural, C., Aksu, D., Yavuzyılmaz, D. K., Ozdemir, G., & Azbar, N. (2019). Effects of size and autoclavation of fruit and vegetable wastes on biohydrogen production by dark dry anaerobic fermentation under mesophilic condition. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(33), 17767–17780. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.05.106>
- Agabo, C., Muñoz, M. L., & Sales, D. (2019). *Aprovechamiento de aguas residuales de los mataderos en el marco de la economía circular. i.*
- Agua.org.mx. (2016). Industria alimentaria usa el 70 por ciento del agua disponible para consumo: Greenpeace – Agua.org.mx. Agua.org.mx. Obtenido de <https://agua.org.mx/industria-alimentaria-usa-el-70-por-ciento-del-agua-disponible-para-consumo-greenpeace/#:~:text=Greenpeace%20comparte%20algunos%20datos%20sobre,para%201%20kilo%20de%20tomate>
- Ahn, Y., Lee, W., Kang, S., & Kim, S. H. (2020). Enhancement of Sewage Sludge Digestion by Co-digestion with Food Waste and Swine Waste. *Waste and Biomass Valorization*, 11(6), 2421–2430. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-00558-w>
- Akroum-Amrouche, D., Abdi, N., Lounici, H., & Mameri, N. (2013). Biohydrogen production by dark and photo-fermentation processes. *Proceedings of 2013 International Renewable and Sustainable Energy Conference, IRSEC 2013*, 499–503. <https://doi.org/10.1109/IRSEC.2013.6529679>
- Alarcón, A. S. (2019). *Producción de bio-hidrógeno por fermentación oscura y enzimática previo tratamiento sonoquímico para la biomasa proveniente de una industria papelera.* Universidad veracruzana.

- Alvarado, A. T. V., Gámez, A. E., Morales, L. F. B., & Ortega-Rubio, A. (2021). Mexico's legal framework regarding wastewater management: A case study of baja california sur. In *Mexican Law Review* (pp. 116–150).
<https://doi.org/10.22201/ijj.24485306e.2021.2.15337>
- Angenent, L. T., Karim, K., Al-Dahhan, M. H., Wrenn, B. A., & Domínguez-Espinosa, R. (2004). Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends in Biotechnology*, 22(9), 477–485.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.07.001>
- Anisha, G. S., & John, R. P. (2014). Bio-engineering algae as a source of hydrogen. In *Advances in Hydrogen Production, Storage and Distribution* (pp. 248–262).
<https://doi.org/10.1533/9780857097736.2.248>
- Arantes, M. K., Sequinel, R., Alves, H. J., Machado, B., Fiorini, A., & da Silva, E. A. (2020). Improvement of biohydrogen production from brewery wastewater: Evaluation of inocula, support and reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(8), 5216–5226. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.208>
- Argun, H., & Dao, S. (2017). Bio-hydrogen production from waste peach pulp by dark fermentation: Effect of inoculum addition Hidayet. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(4), 2569–2574.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.225>
- Argun, H., & Kargi, F. (2011). Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13), 7443–7459. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.116>
- Argun, H., Kargi, F., & Kapdan, I. K. (2009). Microbial culture selection for bio-hydrogen production from waste ground wheat by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(5), 2195–2200. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.12.066>
- Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I. K., & Oztekin, R. (2008). Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(7), 1813–1819. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.01.038>

- Arimi, M. M., Knodel, J., Kiprop, A., Namango, S. S., Zhang, Y., & Geißen, S. U. (2015). Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: A review. *Biomass and Bioenergy*, *75*, 101–118. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.02.011>
- Azad, A. K., & Rasul, M. (2019). Advanced biofuels: Applications, technologies and environmental sustainability. In *Advanced Biofuels: Applications, Technologies and Environmental Sustainability*. <https://doi.org/10.1016/C2018-0-00461-2>
- 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*, 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110023>
- Balat, M. (2008). Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems. *International Journal of Hydrogen Energy*, *33*(15), 4013–4029. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.047>
- Bando, Y., Fujimoto, N., Suzuki, M., & Ohnishi, A. (2013). A microbiological study of biohydrogen production from beer lees. *International Journal of Hydrogen Energy*, *38*(6), 2709–2718. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.11.142>
- Banu J, R., Usman T M, M., S, K., Kannah R, Y., K N, Y., P, S., Bhatnagar, A., & Kumar, G. (2021). A critical review on limitations and enhancement strategies associated with biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, *46*(31), 16565–16590. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.01.075>
- Barba, F. J., Ahrné, L., Xanthakis, E., Landerslev, M. G., & Orlie, V. (2018). Innovative technologies for food preservation. In *Innovative technologies for food preservation: Inactivation of spoilage and pathogenic microorganisms* (pp. 25–51). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811031-7.00002-9>
- Bardhan, S. K., Gupta, S., Gorman, M. E., & Haider, M. A. (2015). Biorenewable chemicals: Feedstocks, technologies and the conflict with food production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *51*, 506–520. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.013>

- Basak, B., Fatima, A., Jeon, B. H., Ganguly, A., Chatterjee, P. K., & Dey, A. (2018). Process kinetic studies of biohydrogen production by co-fermentation of fruit-vegetable wastes and cottage cheese whey. *Energy for Sustainable Development*, *47*, 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2018.08.004>
- Behera, B. K., & Varma, A. (2016). Microbial resources for sustainable energy. In *Microbial Resources for Sustainable Energy*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-33778-4>
- Bernardo Ruggeri, Tonia Tommasi, S. S. (2015). *BioH₂ & BioCH₄ Through Anaerobic Digestion*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4471-6431-9>
- Bharathiraja, B., Sudharsanaa, T., Bharghavi, A., Jayamuthunagai, J., & Praveenkumar, R. (2016). Biohydrogen and Biogas – An overview on feedstocks and enhancement process. *Fuel*, *185*, 810–828. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.08.030>
- Boutard, M., Cerisy, T., Nogue, P. Y., Alberti, A., Weissenbach, J., Salanoubat, M., & Tolonen, A. C. (2014). Functional Diversity of Carbohydrate-Active Enzymes Enabling a Bacterium to Ferment Plant Biomass. *PLoS Genetics*, *10*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004773>
- Brindhadevi, K., Shanmuganathan, R., Pugazhendhi, A., Gunasekar, P., & Manigandan, S. (2021). Biohydrogen production using horizontal and vertical continuous stirred tank reactor- a numerical optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*, *46*(20), 11305–11312. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.155>
- Brockway, P. E., Owen, A., Brand-Correa, L. I., & Hardt, L. (2019). Estimation of global final-stage energy-return-on-investment for fossil fuels with comparison to renewable energy sources. *Nature Energy*, *4*, 612–621. <https://doi.org/10.1038/s41560-019-0425-z>
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J. P., Ruiz-Filippi, G., & Trably, E. (2017). Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(2), 158–181. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw043>

- Cai, G., Jin, B., Saint, C., & Monis, P. (2011). Genetic manipulation of butyrate formation pathways in *Clostridium butyricum*. *Journal of Biotechnology*, *155*(3), 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.07.004>
- Cappelletti, B. M., Reginatto, V., Amante, E. R., & Antônio, R. V. (2011). Fermentative production of hydrogen from cassava processing wastewater by *Clostridium acetobutylicum*. *Renewable Energy*, *36*(12), 3367–3372. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.05.015>
- Castelló, E., Nunes Ferraz-Junior, A. D., Andreani, C., Anzola-Rojas, M. del P., Borzacconi, L., Buitrón, G., Carrillo-Reyes, J., Gomes, S. D., Maintinguer, S. I., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Schiappacasse-Dasati, M., Tapia-Venegas, E., Valdez-Vázquez, I., Vesga-Baron, A., Zaiat, M., & Etchebehere, C. (2020). Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *119*(May). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>
- Castillo-Hernández, A., Mar-Alvarez, I., & Moreno-Andrade, I. (2015). Start-up and operation of continuous stirred-tank reactor for biohydrogen production from restaurant organic solid waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, *40*(48), 17239–17245. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.04.046>
- Chen, C. C., Chuang, Y. S., Lin, C. Y., Lay, C. H., & Sen, B. (2012). Thermophilic dark fermentation of untreated rice straw using mixed cultures for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, *37*(20), 15540–15546. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.036>
- Chen, W. M., Tseng, Z. J., Lee, K. S., & Chang, J. S. (2005). Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, *30*(10), 1063–1070. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.09.008>
- Cheong, D. Y., & Hansen, C. L. (2007). Feasibility of hydrogen production in thermophilic mixed fermentation by natural anaerobes. *Bioresource Technology*, *98*(11), 2229–2239. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.039>

- Chong, M. L., Sabaratnam, V., Shirai, Y., & Hassan, M. A. (2009). Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, *34*(8), 3277–3287.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.010>
- Cieciura-Włoch, W., & Borowski, S. (2019). Biohydrogen production from wastes of plant and animal origin via dark fermentation. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, *27*(2), 101–113. <https://doi.org/10.3846/jeelm.2019.9806>
- Cirne, D. G., Delgado, O. D., Marichamy, S., & Mattiasson, B. (2006). *Clostridium lundense* sp. nov., a novel anaerobic lipolytic bacterium isolated from bovine rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *56*(3), 625–628.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.63730-0>
- Cruz-López, A., Cruz-Méndez, A., Suárez-Vázquez, S. I., Reyna-Gómez, L. M., Pecina-Chacón, D. E., & de León Gómez, H. (2022). Effect of Hydraulic Retention Time on Continuous Biohydrogen Production by the Codigestion of Brewery Wastewater and Cheese Whey. *Bioenergy Research*, *0123456789*. <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10399-0>
- Del Angel-Acosta, Y. A., Alvarez, L. H., Garcia-Reyes, R. B., Carrillo-Reyes, J., Garcia-Gonzalez, A., & Meza-Escalante, E. R. (2021). Co-digestion of corn (nejayote) and brewery wastewater at different ratios and pH conditions for biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, *46*(54), 27422–27430.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.05.208>
- Del Pilar Anzola-Rojas, M., Da Fonseca, S. G., Da Silva, C. C., De Oliveira, V. M., & Zaiat, M. (2015). The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. *Biotechnology Reports*, *5*, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.10.010>
- Dinç, D. T., & Akdoğan, E. C. (2019). Renewable energy production, energy consumption and sustainable economic growth in Turkey: A VECM approach. *Sustainability (Switzerland)*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/su11051273>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric

Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*.
<https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

Dzulkarnain, E. L. N., Audu, J. O., Wan Dagang, W. R. Z., & Abdul-Wahab, M. F. (2022). Microbiomes of biohydrogen production from dark fermentation of industrial wastes: current trends, advanced tools and future outlook. *Bioresources and Bioprocessing*, 9(16), 1–25. <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00504-8>

Enerdata. (2022). Fossil Fuels Primary Consumption Projections | 2050 Fossil Fuels Forecasts | Enerdata. Eneroutlook.enerdata.net. Obtenido de <https://eneroutlook.enerdata.net/projection-fossil-primary-consumption.html>.

España-Gamboa, E., Domínguez-Maldonado, J. A., Tapia-Tussell, R., Chale-Canul, J. S., & Alzate-Gaviria, L. (2018). Corn industrial wastewater (nejayote): a promising substrate in Mexico for methane production in a coupled system (APCR-UASB). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(1), 712–722. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0479-z>

Estevam, A., Arantes, M. K., Andrigheto, C., Fiorini, A., da Silva, E. A., & Alves, H. J. (2018). Production of biohydrogen from brewery wastewater using *Klebsiella pneumoniae* isolated from the environment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(9), 4276–4283. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.052>

Ferreira, A., Marques, P., Ribeiro, B., Assemany, P., de Mendonça, H. V., Barata, A., Oliveira, A. C., Reis, A., Pinheiro, H. M., & Gouveia, L. (2018). Combining biotechnology with circular bioeconomy: From poultry, swine, cattle, brewery, dairy and urban wastewaters to biohydrogen. *Environmental Research*, 164, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.02.007>

Friedlingstein, P., Jones, M. W., O’Sullivan, M., Andrew, R. M., Hauck, J., Peters, G. P., Peters, W., Pongratz, J., Sitch, S., Le Quéré, C., DBakker, O. C. E., Canadell, J. G., Ciais, P., Jackson, R. B., Anthoni, P., Barbero, L., Bastos, A., Bastrikov, V., Becker, M., ... Zaehle, S. (2019). Global carbon budget 2019. *Earth System Science Data*, 11, 1783–1838. <https://doi.org/10.5194/essd-11-1783-2019>

Gadhe, A., Sonawane, S. S., & Varma, M. N. (2013). Optimization of conditions for

hydrogen production from complex dairy wastewater by anaerobic sludge using desirability function approach. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(16), 6607–6617. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.03.078>

García-Depraect, O., Gómez-Romero, J., León-Becerril, E., & López-López, A. (2017). A novel biohydrogen production process: Co-digestion of vinasse and Nejayote as complex raw substrates using a robust inoculum. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(9), 5820–5831. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.204>

García-Depraect, O., & León-Becerril, E. (2018). Fermentative biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate-acetate pathway: Operational performance, kinetic analysis and microbial ecology. *Fuel*, 234, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.06.126>

García-Peña, E. I., Canul-Chan, M., Chairez, I., Salgado-Manjarez, E., & Aranda-Barradas, J. (2013). Biohydrogen production based on the evaluation of kinetic parameters of a mixed microbial culture using glucose and fruit-vegetable waste as feedstocks. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, 279–293. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0341-9>

Ghimire, A. (2016). Dark fermentative biohydrogen production from organic waste and application of by-products in a biorefinery Anish Ghimire To cite this version : HAL Id : tel-01404689 Biofuels Waste Treatment Waste Biomass based Biore fi nery Energy and Sustainability Bio. *Thesis*.

Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73–95. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>

Ghimire, A., Sposito, F., Frunzo, L., Trably, E., Escudié, R., Pirozzi, F., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2016). Effects of operational parameters on dark fermentative hydrogen production from biodegradable complex waste biomass. *Waste Management*, 50, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.01.044>

Gielen, D., Boshell, F., Saygin, D., Bazilian, M. D., Wagner, N., & Gorini, R. (2019). The

- role of renewable energy in the global energy transformation. *Energy Strategy Reviews*, 24, 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.esr.2019.01.006>
- Gomez-Romero, J., Gonzalez-Garcia, A., Chairez, I., Torres, L., & García-Peña, E. I. (2014). Selective adaptation of an anaerobic microbial community: Biohydrogen production by co-digestion of cheese whey and vegetables fruit waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(24), 12541–12550. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.050>
- Grenov, B., Briend, A., Sangild, P. T., Thymann, T., Rytter, M. H., Hother, A. L., Mølgaard, C., & Michaelsen, K. F. (2016). Undernourished Children and Milk Lactose. *Food and Nutrition Bulletin*, 37(1), 85–99. <https://doi.org/10.1177/0379572116629024>
- Hafez, H., Nakhla, G., El. Naggar, M. H., Elbeshbishy, E., & Baghchehsaraee, B. (2010). Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(1), 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.051>
- Hallenbeck, P. C., Abo-Hashesh, M., & Ghosh, D. (2012). Strategies for improving biological hydrogen production. *Bioresource Technology*, 110, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.103>
- Hallenbeck, P. C., & Ghosh, D. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology*, 27(5), 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.004>
- Harrison, S. T. L. (2011). Engineering Fundamentals of Biotechnology. *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*.
- Hernández-Mendoza, C. E., Moreno-Andrade, I., & Buitrón, G. (2014). Comparison of hydrogen-producing bacterial communities adapted in continuous and discontinuous reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(26), 14234–14239. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.01.014>
- Hussy, I., Hawkes, F. R., Dinsdale, R., & Hawkes, D. L. (2005). Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. *International Journal of Hydrogen*

- Energy*, 30(5), 471–483. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.04.003>
- IEA. (2017). IEA finds CO₂ emissions flat for third straight year even as global economy grew in 2016. *International Energy Agency*.
- IRENA. (2020). Renewable Capacity Statistics 2020. In *International Renewable Energy Agency*.
- Johnston, B., Mayo, M. C., & Khare, A. (2005). Hydrogen: The energy source for the 21st century. *Technovation*, 25(6), 569–585.
<https://doi.org/10.1016/j.technovation.2003.11.005>
- Kamran, M. (2021). Bioenergy. *Renewable Energy Conversion Systems*, 243–264.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823538-6.00002-6>
- Kapdan, I. K., Kargi, F., Oztekin, R., & Argun, H. (2009). Bio-hydrogen production from acid hydrolyzed wheat starch by photo-fermentation using different *Rhodobacter* sp. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(5), 2201–2207.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.01.017>
- Khantib, S., & Reungsang, A. (2014). Co-digestion of oil palm trunk hydrolysate with slaughterhouse wastewater for thermophilic bio-hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KCU19. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(13), 6872–6880. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.02.073>
- Khan, M. A., Ngo, H. H., Guo, W. S., Liu, Y., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Deng, L. J., Wang, J., & Wu, Y. (2016). Optimization of process parameters for production of volatile fatty acid, biohydrogen and methane from anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 219, 738–748. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.073>
- Kim, M. K., & Jung, H. Y. (2009). *Pseudoclavibacter soli* sp. nov., a β -glucosidase-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(4), 835–838. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65627-0>
- Kivistö, A., Santala, V., & Karp, M. (2013). Non-sterile process for biohydrogen and 1,3-propanediol production from raw glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(27), 11749–11755. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.06.119>

- Koskinen, P. E. P., Kaksonen, A. H., & Puhakka, J. A. (2007). The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized-bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(4), 742–758. <https://doi.org/10.1002/bit.21299>
- 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*, 35(24), 13445–13451. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.128>
- Levin, D. B., Carere, C. R., Cicek, N., & Sparling, R. (2009). Challenges for biohydrogen production via direct lignocellulose fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7390–7403. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.091>
- Li, Y., & Jin, Y. (2015). Effects of thermal pretreatment on acidification phase during two-phase batch anaerobic digestion of kitchen waste. *Renewable Energy*, 77, 550–557. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.12.056>
- Liang, Z., Wang, J., Zhang, Y., Han, C., Ma, S., Chen, J., Li, G., & An, T. (2020). Removal of volatile organic compounds (VOCs) emitted from a textile dyeing wastewater treatment plant and the attenuation of respiratory health risks using a pilot-scale biofilter. *Journal of Cleaner Production*, 253, 120019. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120019>
- Lin, C. Y., & Lay, C. H. (2004). Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(1), 41–45. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00083-1](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00083-1)
- Lin, C. Y., & Lay, C. H. (2005). A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(3), 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.03.002>
- Lin, Chiu Yue, Chiang, C. C., Thi Nguyen, M. L., & Lay, C. H. (2017). Enhancement of fermentative biohydrogen production from textile desizing wastewater via coagulation-pretreatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(27), 12153–12158. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.03.184>

- Liou, J. S. C., Balkwill, D. L., Drake, G. R., & Tanner, R. S. (2005). *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 2085–2091. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63482-0>
- Lukajtis, 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(March), 665–694. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). Brock - Biología de los microorganismos. In *Metabolismo microbiano*.
- Mang, S., Schwaiger, K., Lindner, R., Gareis, M., & Dorn-In, S. (2021). High incidence of cold-tolerant *Clostridium frigorophilum* and *C. algidicarnis* in vacuum-packed beef on retail sale in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 340, 109053. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109053>
- Martínez, V., & García, R. (2010). Fermentación oscura, fotofermentación y biofotólisis: análisis de su aplicación en secuencia para la producción de hidrógeno biológico. *Dirección General de Investigación y Desarrollo Armada Argentina*, 23, 7. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2415.9844>
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Mazareli, R. C. d. S., Villa-Montoya, A. C., Delforno, T. P., Centurion, V. B., Maia de Oliveira, V., Silva, E. L., & Amâncio Varesche, M. B. (2020). Metagenomic analysis of autochthonous microbial biomass from banana waste: Screening design of factors that affect hydrogen production. *Biomass and Bioenergy*, 138, 105573. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105573>
- Méndez, A. C. (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. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mizuno, O., Shinya, M., & Noike, K. S. J. Y. T. (2000). Effect of pH on Hydrogen Production from Noodle Manufacturing Wastewater. *Environmental Engineering Research*, *37*, 97–106. <https://doi.org/10.11532/proes1992.37.97>
- Murray, W. D., Khan, A. W., & Van den Berg, L. (1982). *Clostridium saccharolyticum* sp. nov., a saccharolytic species from sewage sludge. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *32*(1), 132–135. <https://doi.org/10.1099/00207713-32-1-132>
- Nasir, I. M., Ghazi, T. I. M., & Omar, R. (2012). Production of biogas from solid organic wastes through anaerobic digestion: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *95*, 321–329. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4152-7>
- Ntaikou, I., Antonopoulou, G., & Lyberatos, G. (2010). Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: A review. *Waste and Biomass Valorization*, *1*, 21–39. <https://doi.org/10.1007/s12649-009-9001-2>
- Oh, S. E., Iyer, P., Bruns, M. A., & Logan, B. E. (2004). Biological hydrogen production using a membrane bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, *87*(1), 119–127. <https://doi.org/10.1002/bit.20127>
- Oh, S. E., Van Ginkel, S., & Logan, B. E. (2003). The Relative Effectiveness of pH Control and Heat Treatment for Enhancing Biohydrogen Gas Production. *Environmental Science and Technology*, *37*(22), 5186–5190. <https://doi.org/10.1021/es034291y>
- Ong, V. Z., & Wu, T. Y. (2020). An application of ultrasonication in lignocellulosic biomass valorisation into bio-energy and bio-based products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *132*, 109924. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109924>
- Oztekin, R., Kapdan, I. K., Kargi, F., & Argun, H. (2008). Optimization of media composition for hydrogen gas production from hydrolyzed wheat starch by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, *33*(15), 4083–4090. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.052>

- Pareek, A., Dom, R., Gupta, J., Chandran, J., Adepu, V., & Borse, P. H. (2020). Insights into renewable hydrogen energy: Recent advances and prospects. *Materials Science for Energy Technologies*, 3, 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2019.12.002>
- Patel, S. K. S., Kumar, P., Mehariya, S., Purohit, H. J., Lee, J. K., & Kalia, V. C. (2014). Enhancement in hydrogen production by co-cultures of Bacillus and Enterobacter. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(27), 14663–14668. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.07.084>
- Patinvoh, R. J., Osadolor, O. A., Chandolias, K., Sárvári Horváth, I., & Taherzadeh, M. J. (2017). Innovative pretreatment strategies for biogas production. *Bioresource Technology*, 224, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.083>
- Pérez-Denicia, E., Fernández-Luqueño, F., Vilariño-Ayala, D., Manuel Montaña-Zetina, L., & Alfonso Maldonado-López, L. (2017). Renewable energy sources for electricity generation in Mexico: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 597–613. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.009>
- Popp, J., Kovács, S., Oláh, J., Divéki, Z., & Balázs, E. (2021). Bioeconomy: Biomass and biomass-based energy supply and demand. *New Biotechnology*, 60, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.10.004>
- Prapinagsorn, W., Sittijunda, S., & Reungsang, A. (2018). Co-digestion of napier grass and its silage with cow dung for bio-hydrogen and methane production by two-stage anaerobic digestion process. *Energies*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/en11010047>
- Preethi, Usman, T. M. M., Rajesh Banu, J., Gunasekaran, M., & Kumar, G. (2019). Biohydrogen production from industrial wastewater: An overview. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100287. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100287>
- QIAGEN. (2018). DNeasy ® Plant Handbook. *Life Sciences*.
- Qin, Y., Li, L., Wu, J., Xiao, B., Hojo, T., Kubota, K., Cheng, J., & Li, Y. Y. (2019). Co-production of biohydrogen and biomethane from food waste and paper waste via recirculated two-phase anaerobic digestion process: Bioenergy yields and metabolic

distribution. *Bioresource Technology*, 276, 325–334.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.004>

- Rajesh Banu, J., Arulazhagan, P., Adish Kumar, S., Kaliappan, S., & Lakshmi, A. M. (2015). Anaerobic co-digestion of chemical- and ozone-pretreated sludge in hybrid upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Desalination and Water Treatment*, 10(1), 3269–3278. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.912156>
- Rambabu, K., Bharath, G., Thanigaivelan, A., Das, D. B., Show, P. L., & Banat, F. (2021). Augmented biohydrogen production from rice mill wastewater through nano-metal oxides assisted dark fermentation. *Bioresource Technology*, 319, 124243. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124243>
- Ramírez-Morales, J. E., Tapia-Venegas, E., Toledo-Alarcón, J., & Ruiz-Filippi, G. (2015). Simultaneous production and separation of biohydrogen in mixed culture systems by continuous dark fermentation. *Water Science and Technology*, 71(9), 1271–1285. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.104>
- Ren, N., Guo, W., Liu, B., Cao, G., & Ding, J. (2011). Biological hydrogen production by dark fermentation: Challenges and prospects towards scaled-up production. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 365–370. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.022>
- REPSOL. (2019). Anuario Estadístico-Energético. *Dirección de Estudios, Octubre*, 169.
- Reyna-Gómez, L. M., Cruz-López, A., Alfaro, J. M., & Suárez-Vázquez, S. I. (2021). Evaluation of the production of biohydrogen during the co-digestion of organic wastes in an upflow hybrid anaerobic reactor. *Chemical Engineering Journal*, 425, 129235. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129235>
- Reyna-Gómez, Lirio María. (2021). *Producción de H₂ a partir de la codigestión de cáscaras de frutas y lodos de una planta tratadora de agua residual a escala laboratorio*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Reyna-Gómez, Lirio María, Molina-Guerrero, C. E., Alfaro, J. M., Vázquez, S. I. S., 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 (Switzerland)*, 11(7), 1–13.

<https://doi.org/10.3390/SU11072139>

Saidi, R., Liebgott, P. P., Hamdi, M., Auria, R., & Bouallagui, H. (2018). Enhancement of fermentative hydrogen production by *Thermotoga maritima* through hyperthermophilic anaerobic co-digestion of fruit-vegetable and fish wastes.

International Journal of Hydrogen Energy, 43(52), 23168–23177.

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.10.208>

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*.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124233>

Scoma, A., Bertin, L., & Fava, F. (2013). Effect of hydraulic retention time on biohydrogen and volatile fatty acids production during acidogenic digestion of dephenolized olive mill wastewaters. *Biomass and Bioenergy*, 48, 51–58.

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.10.028>

SEMARNAT. (2003). Normas Oficiales Mexicanas. *NOM-004-SEMARNAT-2002*, 66.

<http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/NormasOficialesMexicanas.pdf>
http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4863829&fecha=06/01/1997

SENER. (2012). Prospectiva de Energías Renovables 2012 - 2026. In *Diario Oficial de la Federación*.

Shervinzakeri, M., & Taghizadeh, M. M. (2014). Review on Renewable Energy , Sustainable Energy and Clean Energies. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, 4(3), 120–123.

Shin, J. H., Yoon, J. H., Lee, S. H., & Park, T. H. (2010). Hydrogen production from formic acid in pH-stat fed-batch operation for direct supply to fuel cell. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.032>

Show, K. Y., Lee, D. J., Tay, J. H., Lin, C. Y., & Chang, J. S. (2012). Biohydrogen

- production: Current perspectives and the way forward. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20), 15616–15631.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.109>
- Show, Kuan Yeow, Lee, D. J., & Chang, J. S. (2011). Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 102(18), 8524–8533.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.055>
- Singh, V., & Das, D. (2018). Potential of hydrogen production from biomass. In *Science and Engineering of Hydrogen-Based Energy Technologies: Hydrogen Production and Practical Applications in Energy Generation* (pp. 123–164).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814251-6.00003-4>
- Sivagurunathan, P., Sen, B., & Lin, C. Y. (2015). High-rate fermentative hydrogen production from beverage wastewater. *Applied Energy*, 147, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.136>
- Srinivasan, S. (2009). The food v. fuel debate: A nuanced view of incentive structures. *Renewable Energy*, 34(4), 950–954. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.08.015>
- Tang, G. L., Huang, J., Sun, Z. J., Tang, Q. Q., Yan, C. H., & Liu, G. Q. (2008). Biohydrogen production from cattle wastewater by enriched anaerobic mixed consortia: Influence of fermentation temperature and pH. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(1), 80–87. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.80>
- Tao, X., Li, J., Zhang, P., Nabi, M., Jin, S., Li, F., Wang, S., & Ye, J. (2017). Reinforced acid-pretreatment of *Triarrhena lutarioriparia* to accelerate its enzymatic hydrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(29), 18301–18308.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.04.149>
- Tapia-Venegas, E., Cabrol, L., Brandhoff, B., Hamelin, J., Trably, E., Steyer, J. P., & Ruiz-Filippi, G. (2015). Adaptation of acidogenic sludge to increasing glycerol concentrations for biohydrogen production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 8295–8308. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6832-6>
- Tiseo, I. (2022). Atmospheric CO₂ concentrations worldwide 1959-2021 | Statista. Statista.

Obtenido de <https://www.statista.com/statistics/1091926/atmospheric-concentration-of-co2-historic/>

- Urbaniec, K., & Bakker, R. R. (2015). Biomass residues as raw material for dark hydrogen fermentation - A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, *40*(9), 3648–3658. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.01.073>
- Ursua, A., Sanchis, P., & Gandia, L. M. (2012). Hydrogen Production from Water Electrolysis : Current Status and Future Trends. *Proceedings of the IEEE*.
- Valdez-Vazquez, I., Morales, A. L., & Escalante, A. E. (2017). History of adaptation determines short-term shifts in performance and community structure of hydrogen-producing microbial communities degrading wheat straw. *Microbial Biotechnology*, *10*(6), 1569–1580. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12678>
- Valta, K., Damala, P., Angeli, E., Antonopoulou, G., Malamis, D., & Haralambous, K. J. (2017). Current Treatment Technologies of Cheese Whey and Wastewater by Greek Cheese Manufacturing Units and Potential Valorisation Opportunities. *Waste and Biomass Valorization*, *8*, 1649–1663. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9862-8>
- Vignais, P. M., Billoud, B., & Meyer, J. (2001). Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*(4), 455–501. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00587.x>
- Wainaina, S., Lukitawesa, Kumar Awasthi, M., & Taherzadeh, M. J. (2019). Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: A critical review. *Bioengineered*, *10*(1), 437–458. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1673937>
- Wang, C. H., Lin, P. J., & Chang, J. S. (2006). Fermentative conversion of sucrose and pineapple waste into hydrogen gas in phosphate-buffered culture seeded with municipal sewage sludge. *Process Biochemistry*, *41*(6), 1353–1358. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.016>
- Wang, H., Zhi, Z., Wang, J., & Ma, S. (2012). Comparison of various pretreatment methods for biohydrogen production from cornstalk. *Bioprocess and Biosystems*

Engineering, 35, 1239–1245. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0711-7>

- Wang, J., & Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2), 799–811. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.015>
- Wang, J., & Yin, Y. (2019). Progress in microbiology for fermentative hydrogen production from organic wastes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41(1), 825–865. <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1487226>
- Wang, M. Y., Olson, B. H., & Chang, J. S. (2008). Relationship among growth parameters for *Clostridium butyricum*, *hydA* gene expression, and biohydrogen production in a sucrose-supplemented batch reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 525–532. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1317-x>
- Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., Peters, E. C., & Siuzdak, G. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10), 3698–3703. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812874106>
- Won, S. G., & Lau, A. K. (2011). Effects of key operational parameters on biohydrogen production via anaerobic fermentation in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, 102(13), 6876–6883. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.078>
- Xia, A., Cheng, J., & Murphy, J. D. (2016). Innovation in biological production and upgrading of methane and hydrogen for use as gaseous transport biofuel. *Biotechnology Advances*, 34(5), 451–472. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.009>
- Yang, H., Shao, P., Lu, T., Shen, J., Wang, D., Xu, Z., & Yuan, X. (2006). Continuous biohydrogen production from citric acid wastewater via facultative anaerobic bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(10), 1306–1313. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2005.11.018>
- Yun, J., Kim, T. G., & Cho, K. S. (2015). Suppression of methanogenesis in hydrogen

- fermentation by intermittent feeding. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 50(14), 1458–1467. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.1074480>
- Zafar, M. W., Sinha, A., Ahmed, Z., Qin, Q., & Zaidi, S. A. H. (2021). Effects of biomass energy consumption on environmental quality: The role of education and technology in Asia-Pacific Economic Cooperation countries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 142, 110868. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110868>
- Zakzeski, J., Bruijninx, P. C. A., Jongerius, A. L., & Weckhuysen, B. M. (2010). The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chemical Reviews*, 110(6), 3552–3599. <https://doi.org/10.1021/cr900354u>
- Zeng, X., Danquah, M. K., Chen, X. D., & Lu, Y. (2011). Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(6), 3252–3260. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.04.014>
- Zhang, K., Ren, N., Guo, C., Wang, A., & Cao, G. (2011). Effects of various pretreatment methods on mixed microflora to enhance biohydrogen production from corn stover hydrolysate. *Journal of Environmental Sciences*, 23(12), 1929–1936. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60679-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60679-1)
- Zhang, Q., You, S., Li, Y., Qu, X., & Jiang, H. (2020). Enhanced biohydrogen production from cotton stalk hydrolysate of *Enterobacter cloacae* WL1318 by overexpression of the formate hydrogen lyase activator gene. *Biotechnology for Biofuels*. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01733-9>
- Zhang, Y., & Shen, J. (2006). Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(4), 441–446. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2005.05.006>
- Zhang, Z. P., Show, K. Y., Tay, J. H., Liang, D. T., & Lee, D. J. (2008). Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors-A comparison of biofilm-based and granule-based systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(5), 1559–1564. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.09.048>

- Zhang, Z. P., Tay, J. H., Show, K. Y., Yan, R., Tee Liang, D., Lee, D. J., & Jiang, W. J. (2007). Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(2), 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.08.017>
- Zou, Y., Liu, F., Fang, C., Wan, D., Yang, R., Su, Q., Yang, R., & Zhao, J. (2013). *Lactobacillus shenzhenensis* sp. nov., isolated from a fermented dairy beverage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(5), 1817–1823. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.041111-0>