



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA**

**PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO A ALTAS CARGAS ORGÁNICAS A PARTIR DE  
EFLUENTES VITIVINÍCOLAS EN SISTEMAS DE BIOMASA FIJA**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN INGENIERÍA**

**PRESENTA:**

**JONATHAN FRANCISCO CORTEZ CERVANTES**

**TUTOR PRINCIPAL**

**DR. JULIÁN CARRILLO REYES, INSTITUTO DE INGENIERÍA**

**COMITÉ TUTORAL**

**DRA. PETIA MIJAYLOVA NACHEVA, INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA**

**DR. JORGE ARREOLA VARGAS, UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE JALISCO**

**MÉXICO, Cd. Mx. SEPTIEMBRE 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dr. Jorge Arreola Vargas  
Secretario: Dr. Daniel de los Cobos Vasconcelos  
Vocal: Dra. Karla María Muñoz Páez  
2<sup>do</sup>. Vocal: Dra. Petia Mijaylova Nacheva  
3<sup>er</sup>. Vocal: Dr. Julián Carrillo Reyes

## **LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:**

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA).  
Unidad Académica Juriquilla, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México,  
Campus Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, 76230 Querétaro, México.

## **TUTOR DE TESIS:**

Dr. Julián Carrillo Reyes

Julián Carrillo R

**FIRMA**

## **FINANCIAMIENTO**

Se agradece el apoyo del Fondo de Sustentabilidad Energética SENER – CONACYT a través del proyecto 247006 Clúster de Biocombustibles gaseosos, por el financiamiento para la realización de esta tesis.

También se agradece al proyecto Ciencia Básica CONACYT 255537 y PAPIIT IA100518.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), al Instituto de Ingeniería, y al Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA), por facilitar el uso de sus instalaciones para la realización del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Julián Carrillo Reyes por estar siempre guiándome en los momentos de incertidumbre a lo largo de la maestría; el apoyo que usted me otorgó durante ésta etapa fue invaluable y necesario para que pudiera seguir adelante.

Al Dr. Jorge Arreola Vargas y la Dra. Petia Mijaylova Nacheva por formar parte de mi comité tutorial y darme cada una de observaciones que enriquecieron el presente trabajo.

A la Mtra. Gloria Moreno Rodríguez y Jaime Pérez Trevilla por su asistencia técnica en el laboratorio y por sus ánimos en tiempos tormentosos.

A mis profesores: Dr. Germán Buitrón, Dra. Idania Valdez, Dr. Alejandro Vargas, Dr. Guillermo Quijano, Mtra. Gloria Moreno y Dr. Iván Moreno por el conocimiento impartido en el aula y la disposición para resolver cualquier duda.

A mis compañeros, Sharon, David, Alejandra, Yara, Dayanira, Yeinner, Adán y Mauricio, por el apoyo otorgado a lo largo de la maestría.

A mis amigos Julián O., Alberto H., Ricardo R, Caro M., Caro A., Karina C. y Felipe O. por compartir todos esos momentos inolvidables. Doy gracias a dios por haberme puesto en mi camino, sin ustedes la maestría hubiera sido un insoportable dolor de cabeza.

A ti Marce, por siempre estar ahí para apoyarme en mis momentos de estrés y ser mi confidente, doy gracias a dios por haberte conocido.

A mis queridos papás por su apoyo incondicional, gracias por confiar en mí a lo largo de mi carrera, ustedes siempre serán mi motivo para seguir adelante.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN .....	7
1. MARCO TEÓRICO .....	9
1.1 COMPOSICIÓN DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA .....	9
1.2 PROBLEMÁTICA EN MÉXICO DEBIDO A LA DESCARGAS DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA .....	9
1.3 VALORIZACIÓN DE LOS EFLUENTES DE LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO .....	10
1.4. PRINCIPIOS DE LA FERMENTACIÓN OSCURA .....	11
1.5. PARÁMETROS OPERATIVOS PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO MEDIANTE FERMENTACIÓN OSCURA .....	11
1.5.1 pH.....	12
1.5.2 Tasa de carga orgánica (TCO).....	12
1.5.3 Temperatura.....	13
1.5.4 Inóculo.....	13
1.6 COMPUESTOS Y ELEMENTOS INHIBITORIOS .....	14
1.6.1 Etanol .....	14
1.7 INHIBICIÓN ENZIMÁTICA .....	15
1.7.1 Inhibición reversible.....	16
1.7.2 Inhibición irreversible .....	17
1.7.3 Modelos de inhibición .....	17
1.8 TIPO DE BIORREACTOR.....	19
1.8.1 Reactores anaerobios de biomasa fija.....	20
2. JUSTIFICACIÓN.....	23
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
4. HIPÓTESIS .....	25
5. METODOLOGÍA .....	26
5.1 EXPERIMENTOS DE INHIBICIÓN .....	26
5.1.1 Inóculo.....	26
5.1.2 Medio mineral .....	26

5.1.3	Determinación de la constante de inhibición ( $K_c$ ) .....	27
5.1.4	Análisis de datos y modelado .....	27
5.2	EXPERIMENTOS EN CONTINUO .....	29
5.2.1	Sustrato.....	29
5.2.2	Inóculo.....	29
5.2.3	Reactores de biomasa fija.....	29
5.2.4	Operación de los reactores de biomasa fija .....	31
5.2.5	Microscopía Electrónica de Barrido .....	31
5.2.6	Determinación de $H_2$ disuelto.....	32
5.3	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	33
5.4	CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD MICROBIANA .....	34
6.	RESULTADOS .....	35
6.1	EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ETANOL EN LA FERMENTACIÓN OSCURA UTILIZANDO SUSTRATO MODELO .....	35
6.1.1	Efecto del etanol en la producción de hidrógeno y tiempo de latencia .....	35
6.1.2	Efecto del etanol en el crecimiento de biomasa y consumo de carbohidratos.....	36
6.1.3	Producción de metabolitos a diferentes concentraciones de etanol.....	37
6.1.4	Dinámica de la comunidad microbiana a distintas concentraciones de etanol .....	38
6.1.5	Determinación de la constante de inhibición ( $K_c$ ).....	40
6.2	EFECTO DE LA CARGA ORGÁNICA EN LA PRODUCCIÓN CONTINUA DE HIDRÓGENO EN SISTEMAS DE BIOMASA FIJA.....	41
6.2.1	Caracterización de los efluentes de la industria vitivinícola .....	41
6.2.2	Colonización de soportes del TBR.....	42
6.2.3	Producción continua de hidrógeno en sistemas de biomasa fija.....	42
6.2.5	Dinámica de la comunidad microbiana ante diferentes TCO.....	46
6.2.6	Morfología bacteriana en los agregados.....	48
6.2.7	Efecto de la configuración del reactor en la concentración de hidrógeno disuelto .....	49
	BIBLIOGRAFÍA.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aguas residuales provenientes del proceso del vino.....	10
Figura 2. Curva del modelo modificado de Han-Levenspiel.....	18
Figura 3. Diagrama de cada una de las etapas que se realizaron en el proyecto .....	26
Figura 4. Sistema AMPTS II.....	27
Figura 5. Diagrama del TBR.....	30
Figura 6. Diagrama del UASB.....	31
Figura 7. Producción de hidrógeno acumulado y tiempo de latencia a diferentes concentraciones de etanol. .....	35
Figura 8. Crecimiento de biomasa medida como SSV y carbohidratos consumidos a diferentes concentraciones de etanol.....	36
Figura 9. Rendimientos durante la fermentación oscura.....	37
Figura 10. Abundancia relativa de bacterias y análisis de agrupamiento por distancias.....	39
Figura 11. Matriz de correlaciones entre distintas variables. Los círculos muestran solo las correlaciones estadísticamente significantes ( $\alpha=0.05$ ). .....	40
Figura 12. Actividad hidrogenogénica específica experimental y simulado por el modelo modificado de Han-Levenspiel. ....	41
Figura 13. Empaques sin colonizar y colonizado.....	42
Figura 14. Reactores de biomasa fija, izquierda TBR y derecha reactor UASB.....	43
Figura 15. Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) en ambos reactores de biomasa fija, (A) TBR y (B) UASB, a distintas tasas de carga orgánica (TCO).....	43
Figura 16. Valores promedio de producción de metabolitos (valores positivos) y consumo de ácidos y solventes presentes en los efluentes (valores negativos) en el TBR (A1) y en el UASB (B1), a las diferentes tasas de carga orgánica (TCO) evaluadas; y relación de metabolitos producidos y ácidos- solventes consumidos en el TBR (A2) y el UASB (B2), en DQO equivalente.....	45



Figura 17. Abundancia relativa de bacterias y análisis de agrupamiento por distancias al final de cada fase de operación (I,II,III, IV).....	46
Figura 18. Micrografía de la superficie de los empaques al final de cada fase. ....	48
Figura 19. Micrografía de gránulo anaerobi de la Fase III.....	49

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de efluentes de la industria vitivinícola en la literatura.....	9
Tabla 2. Impacto ambiental de la descarga de efluentes vitivinícolas.....	10
Tabla 3. Rangos de distintos parámetros utilizados para la producción de hidrógeno por fermentación oscura. ....	12
Tabla 4. Compuestos con rangos óptimos e inhibitorios reportados para la digestión anaerobia y fermentación oscura .....	15
Tabla 5. Modelos utilizados para metabolitos de la fermentación de inhibición para el etanol.....	19
Tabla 6. Reactores para la producción de hidrógeno a partir de efluentes vitivinícolas o sustratos con características similares.....	20
Tabla 7. Trabajos donde evaluaron el efecto de la TCO en reactores de biomasa fija.....	21
Tabla 8. Dimensiones de los reactores TBR y UASB.....	29
Tabla 9. Resumen de las diferentes TCO que se emplearan durante el experimento.....	31
Tabla 10. Concentraciones de etanol y tiempo de lavados.....	32
Tabla 11. Caracterización de los efluentes de la industria vitivinícola utilizados en el proceso.....	41
Tabla 12. VVPH estables en el TBR y UASB a diferentes TCO.....	44
Tabla 13. Trabajos que han producido hidrógeno con efluentes vitivinícolas y sustratos similares.....	44
Tabla 14. Concentración de hidrógeno disuelto en el efluente.....	50

## RESUMEN

El incremento en la producción de vino en México conlleva al aumento de la producción de aguas residuales o efluentes vitivinícolas. El vertido de efluentes vitivinícolas en el ambiente puede ocasionar contaminación al suelo o a aguas subterráneas, debido a que tienen una alta cantidad de materia orgánica y compuestos recalcitrantes. Una forma de aprovechar estos residuos es emplearlos como sustrato para la producción de hidrógeno mediante la fermentación oscura, debido a su alto contenido de carbohidratos, nutrientes y materia orgánica. Sin embargo, los efluentes vitivinícolas contienen una alta concentración de etanol que ronda los 105 g/L, lo que pudiera ocasionar un efecto inhibitorio en la producción de hidrógeno, al disminuir el crecimiento de las bacterias productoras de hidrógeno y alterar sus capacidades funcionales. Una manera de contrarrestar el efecto inhibitorio del etanol es emplear sistemas de biomasa fija para la producción de hidrógeno, ya que estos son capaces de soportar altas concentraciones de compuestos inhibitorios y altas tasas de carga orgánica debido a su alta concentración de microorganismos. En el presente trabajo, inicialmente se evaluó el efecto inhibitorio del etanol en lote empleando glucosa como sustrato modelo. Destacando que el aumento en la concentración de etanol disminuyó la producción de hidrógeno y el consumo de carbohidratos; mientras que aumentó el tiempo de latencia. Además, se observó un cambio de las rutas metabólicas de los microorganismos, ya que a partir de una concentración de etanol de 18 g/L disminuyó la producción de ácido láctico y butírico. Entre tanto, existió una correlación negativa significativa con el ácido butírico y la producción de hidrógeno con la presencia de etanol. Para predecir el efecto del etanol en la actividad hidrogenogénica, se ajustaron los resultados al modelo modificado de Han-Levenspiel, de donde se obtuvo una constante de inhibición de 28.9 g/L. En una segunda etapa, se evaluó la producción de hidrógeno en reactores continuo. En estos sistemas en continuo se evaluaron distintas cargas orgánicas desde 202 a 1010 g DQO/L-d, alimentados con efluentes vitivinícolas, un sistema basado en biopelícula y una granular, TBR y UASB, por sus siglas en inglés, respectivamente. Tanto el TBR y UASB a una tasa de carga orgánica (TCO) de 505 g DQO/L-d, obtuvieron la máxima velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) estable de  $142 \pm 12$  y  $78 \pm 6$  mL H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>-h; y mayores rendimientos de  $7 \pm 1$  y  $4 \pm 1$  mL H<sub>2</sub>/g DQO<sub>a</sub> respectivamente. El TBR logró un aumento del 82% en la VVPH estable, dado a que en el sistema no se observó consumo de hidrógeno, en cambio en el UASB se notó un consumo de hidrógeno en la fase líquida; calculado mediante la determinación de hidrógeno disuelto en el efluente de ambos reactores operando a la TCO donde se alcanzó la mayor VVPH estable. Adicionalmente, en este trabajo se demostró que el uso de los efluentes vitivinícolas crudos para la producción de hidrógeno no es factible, debido a la proliferación de bacterias ácido lácticas, desplazando aquellas bacterias productoras de hidrógeno.

## INTRODUCCIÓN

En el 2016, los combustibles fósiles suministraron el 85.5% de las necesidades energéticas del mundo ocasionando el agotamiento gradual de sus limitadas reservas (BP 2017; Sinha and Pandey 2011). Se tiene una proyección que para el 2040, los combustibles fósiles representarán el 77% del uso mundial de energía, lo que incrementará las emisiones de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) aumentando en un 34% con una tasa de 66 mil millones de toneladas por año, incrementando el calentamiento global y consecuentes problemas ambientales (IEA 2017). En este sentido, es necesario buscar fuentes de energías limpias que permitan evitar la sobreexplotación de los combustibles fósiles y disminuir las emisiones de efecto invernadero (Noblecourt et al., 2018). El hidrógeno es visto como una fuente prometedora de energía, debido que no produce gases de efecto invernadero durante su combustión, únicamente vapor de agua; y su elevado contenido energético por unidad de peso (122-144 kJ/g), el cual es mayor a cualquier combustible conocido actualmente (Andr, Londo, and Rodr 2012; Buitrón, Kumar, and Moreno 2014).

En la actualidad existen varios procesos para la obtención de hidrógeno, entre ellos, el método de reformado con vapor de metano, reformado con vapor de agua, oxidación parcial de combustibles fósiles, reformado autotérmico de hidrocarburos y electrolisis del agua (García 2014). No obstante, el uso de estos métodos requiere altas cantidades de energía para su funcionamiento. Por otra parte, la producción biológica de hidrógeno es un proceso sustentable y renovable, en donde el proceso de fermentación oscura no requiere grandes cantidades de energía, sus costos de operación son más bajos y se puede emplear residuos como sustrato (Bundhoo & Mohee, 2016; Liu, 2008; Stamatelatou et al., 2014). Para la producción de hidrógeno por fermentación oscura el residuo debe contener una alta concentración de carbohidratos biodegradables (los cuales funcionarían como sustrato) y un pH ácido (4.5-6.0).

La industria del vino ha estado en continuo crecimiento a nivel nacional y en la entidad de Querétaro, lo que ha conllevado al aumento en la generación de efluentes vitivinícolas. Estos residuos contienen características que son favorables para la producción de hidrógeno mediante la fermentación oscura, tales como un pH ácido (3.5 - 5), alto contenido de materia orgánica (carbohidratos, bacterias y levaduras, vivas o muertas y proteínas), bajo nitrógeno total y valores de demanda química de oxígeno (DQO) oscilando de 220-390 g/L (Consejo Mexicano de Vitivinícola, 2017; Asociación de Vitivinicultores de Querétaro, 2017; Benitez et al., 2003; España-Gamboa et al., 2011). Aunque, contienen una alta concentración de etanol (105 g/L) que es capaz de inhibir el proceso de fermentación oscura (Albarrán-Contreras, 2017; Mejía-Saucedo 2018). En este contexto, es necesario emplear una configuración de reactor capaz de soportar altas tasas de carga orgánica (TCO) debido a la alta concentración de DQO y resistir una alta concentración de etanol. Los sistemas de biomasa fija representan una opción favorable, ya que han sido reportados en la producción de hidrógeno a altas TCO (Ferraz Júnior et al., 2014; Krishnan et al., 2016; D.-Y. Lee et al., 2014; Shen et al., 2009), además de su alta tolerancia a compuestos inhibitorios en comparación con los sistemas de biomasa suspendida (Buitrón et al., 2014; España-Gamboa et al., 2011; Fuess et al., 2016; Lee et al., 2004).

Dentro de los sistemas de biomasa fija podemos encontrar los reactores granulares y de lecho percolador, los cuales han sido reportados en la producción de hidrógeno operando altas TCO alimentando con distintos sustratos modelos, como glucosa y xilosa (Arreola-Vargas et al. 2015; Lim

and Kim 2014). Los sistemas granulares tienen las ventajas de no presentar lavado de biomasa y no presentan inconvenientes de elevadas variaciones en las velocidades de flujo ascendente, mientras el lecho percolador, se puede lograr una alta transferencia de la fase líquida hacia la fase gaseosa y disminuir la inhibición del proceso por la alta presión parcial del hidrógeno (Van Groenestijn et al. 2009; Mohammadi et al. 2017). Por lo tanto, el presente trabajo pretende comparar el efecto de la TCO en la producción de hidrógeno en dos sistemas de biomasa de fija, un filtro percolador y uno granular, a partir de efluentes vitivinícola. Además, se evaluará la inhibición del etanol en la producción de hidrógeno utilizando el modelo modificado de Han-Levenspiel y glucosa como sustrato modelo.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 COMPOSICIÓN DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA

Durante el proceso de elaboración del vino, los residuos obtenidos después de la fermentación de la uva contienen altas cargas de materia orgánica (bacterias y levaduras, vivas o muertas, y proteínas solubles) y otros compuestos. En este sentido, los efluentes de la industria vitivinícola se caracterizan por además de tener un alto contenido de materia orgánica, presentar pH ácidos que las vuelve extremadamente corrosivas (Albarrán-Contreras 2017; Mejía-Saucedo 2018). En la Tabla 1, se muestra la composición de efluentes de la industria vitivinícola provenientes de viñedos locales del estado de Querétaro y distintos países; la diferente composición se puede deber a factores como el tipo de vino de producción, condiciones climáticas, el volumen de los tanques que se utilizan y su proceso de elaboración (Santos et al., 2009; Vlyssides et al., 2005).

Tabla 1. Composición de efluentes de la industria vitivinícola en la literatura

Parámetro	Unidades	TQ	BQ	BG	TG	VE
pH	-	3.4	3.5	6.0	6.2	5.5
Sólidos Totales (ST)	g/L	153.9	57.7	3.9	4.1	18.4
Sólidos Volátiles (SV)	g/L	24.3	51.1	3.4	3.7	12.4
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	g/L	65.6	34.2	0.1	0.2	ND
Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)	g/L	4.9	32.7	0.1	0.2	ND
Demanda Química de Oxígeno Total (DQO <sub>total</sub> ) <sup>1</sup>	g/L	220.6	252.4	3.1	3.997	50.0
Carbohidratos Totales	g/L	49.6	32.9	ND	ND	ND
Fenoles	mg/L	83.0	197	280.0	1450	140.0
Carbono soluble	g/L	56.3	49.6	ND	ND	2.16
Nitrógeno soluble	g/L	1.3	0.5	ND	ND	0.03
Fósforo soluble	mg/L	18.4	287	7.0	8.5	0.03
Sulfatos	mg/L	170.0	175	ND	ND	ND
Cloruros	mg/L	27.8	101	ND	ND	ND
Fosfatos	g/L	1.5	0.3	ND	ND	ND
Hierro	µg/L	0.3	180	ND	ND	12000.0
Cobre	µg/L	2.8	48	ND	ND	790.0
Zinc	µg/L	1.6	737	ND	ND	580.0
Plomo	µg/L	0.3	ND	ND	ND	1090.0
Calcio	mg/L	88.9	ND	ND	ND	545.0
Potasio	g/L	1.4	ND	ND	ND	270.0
Magnesio	mg/L	99.0	ND	ND	ND	36.0
Sodio	mg/L	20.7	ND	ND	ND	158.0
Etanol	g/L	105.0	55.9	ND	ND	ND

Efluente de vino producido en diferentes bodegas de Querétaro, tinto TQ (Mejía-Saucedo 2018); blanco BQ (Albarrán-Contreras, 2017); Efluente de vino producido de bodegas de Grecia, tinto TG; blanco BG (Vlyssides et al., 2005); Efluente de vino producido de una bodega de España, VE (Bustamente et al., 2005); No determinado (ND).

## 1.2 PROBLEMÁTICA EN MÉXICO DEBIDO A LA DESCARGAS DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA

Anualmente en México se producen 19 millones de litros de vino con un aumento en la tasa anual del 8%, reflejando un gran potencial de desarrollo de la industria vitivinícola en el país (Consejo Mexicano de Vitivinícola, 2017). En el estado de Querétaro, se tienen reportes de una producción de 2 millones de litros de vino al año colocándose como líder en el país en la elaboración de vino espumoso, teniendo un ritmo de crecimiento del 15 a 20% anual (Asociación de Vitivinicultores de Querétaro, 2017). Sin embargo, el aumento en la producción de vino viene ligado con un incremento en la descarga de aguas residuales producidas mediante operaciones de procesamiento, prácticas de limpieza de bodegas,

operaciones de lavado durante la trituración, prensado de uvas, enjuague de tanques de fermentación, lavado de barriles y embotellado (Figura 1). Destacando que la producción del agua residual, varía de 0.7 a 1.2 litros por cada litro de vino producido (Andreottola et al., 2009).

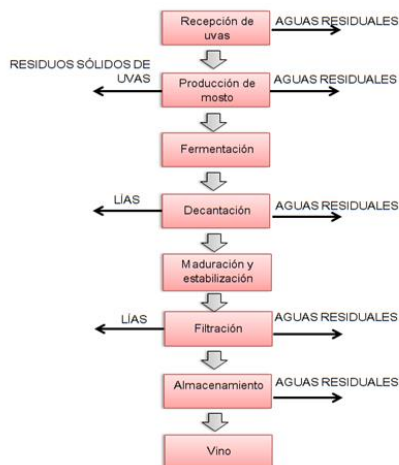


Figura 1. Aguas residuales provenientes del proceso del vino.

A principios de los años 70's, los efluentes de la industria vitivinícola solían ser depositadas directamente en suelos destinados a agricultura, debido a que se creía que por su alto contenido de nutrientes era posible enriquecer los suelos de una manera económica (Rajagopal et al. 2014). Sin embargo, recientes investigaciones indican que la descarga directa contamina el suelo y las aguas subterráneas (Melamane et al., 2007). Igualmente, las descargas ilícitas y bajo ninguna regulación ambiental, constituye una problemática ambiental debido a su elevado potencial de contaminación, ocasionado principalmente por su acidez, alta carga de materia orgánica y la presencia de componentes recalcitrantes (Tabla 2), es por ello que es necesaria la aplicación de tecnologías adecuadas que permitan el aprovechamiento de este tipo de efluentes para reducir la afectación al ambiente causada por los mismos (Chapman et al., 1998; Buitrón et al. 2014).

Tabla 2. Impacto ambiental de la descarga de efluentes vitivinícolas

Parámetro	Posible impacto ambiental
<b>Volumen</b>	Anegamiento, baja aireación en los suelos y malos olores
<b>Sólidos</b>	Obstrucción de poros, reducción de oxígeno y disminución de la permeabilidad del agua
<b>Carbono orgánico</b>	Remoción del oxígeno durante la degradación
<b>Nitrógeno, fósforo</b>	Eutrofización de cuerpos de agua
<b>pH</b>	Acidificación del suelo
<b>Sulfuros</b>	Malos olores
<b>Sodicidad</b>	Disminución de la estabilidad estructural del suelo que conduce a la baja infiltración, baja aireación, compactación, obstrucción de poros y erosión
<b>DQO</b>	Reducción del oxígeno en el agua

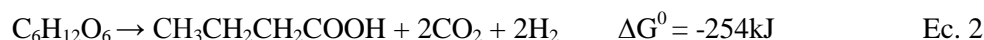
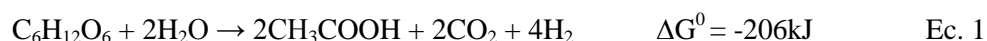
### 1.3 VALORIZACIÓN DE LOS EFLUENTES DE LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

Existen diversos métodos biológicos para la producción de hidrógeno, tal como procesos fotosintéticos y fermentativos (Cardoso et al. 2014). La fermentación oscura es considerada la más favorable, puesto que permite la obtención de hidrógeno a altas tasas y de manera continua (Andr et al., 2012). Además, se puede valorizar un residuo para obtener hidrógeno y el consumo de energía son hasta 340 veces más

bajos que en procesos de producción como biofotólisis indirecta y directa, y foto-fermentación (Stamatelatou et al. 2014). Debido a esto, la fermentación oscura es considerada la más prometedora en términos de rendimientos y viabilidad y su potencial es más realista de ser comercializado en un futuro próximo (Bundhoo and Mohee 2016; Stamatelatou et al. 2014).

#### 1.4. PRINCIPIOS DE LA FERMENTACIÓN OSCURA

La fermentación oscura es la conversión de componentes orgánicos a biogás ( $H_2$  y  $CO_2$ ) y obtención de metabolitos como etanol y ácidos grasos volátiles, en ausencia de oxígeno llevado a cabo por un grupo de bacterias anaerobias utilizando sistemas multienzimáticos (Rezania et al. 2017). La generación de hidrógeno se logra principalmente por bacterias estrictamente anaerobias o anaerobias facultativas, las cuales no requieren una fuente de luz y utilizan sustratos ricos en carbohidratos para ser metabolizados en reacciones bioquímicas. En general son especies del género *Clostridium* formadoras de esporas, facultativas de los géneros *Enterobacter* y *Bacillus*, algunas bacterias anaerobias termofílicas y acidogénicas (Andr et al. 2012). Las fermentaciones pueden llevarse a cabo a diferentes temperaturas desde mesófilas ( $25^{\circ}C-40^{\circ}C$ ) hasta termófilas ( $>50^{\circ}C$ ) produciéndose biogás con contenido de  $H_2$ ,  $CO_2$ ,  $CO$ ,  $H_2S$  y en algunas casos,  $CH_4$  (Bedoya et al., 2007). Entre los productos finales generados por los diferentes metabolismos microbianos durante la fermentación oscura, se encuentran el ácido acético, ácido butírico, ácido propiónico, ácido láctico, butanol y etanol. Cuando el ácido acético es el único ácido graso volátil (AGV) producido, la producción teórica es de 4 mol  $H_2$  por mol de glucosa (Ec. 1); mientras que en la vía de ácido butírico, hay un menor rendimiento molar de hidrógeno, se observa 2 mol  $H_2$  por mol de glucosa (Ec. 2) (Liu 2008).



Mientras un bajo rendimiento de producción de hidrógeno está ligado a la producción de ácido propiónico, alcohol y ácido láctico (Liu 2008). Actualmente, el proceso de fermentación oscura no ha sido comercialmente explotado debido a las limitaciones del bajo rendimiento de hidrógeno y la baja tasa de producción, lo que al momento hace que el proceso sea inviable a gran escala. La baja producción de hidrógeno por fermentación oscura se puede atribuir a numerosos parámetros del proceso (Bundhoo and Mohee 2016). A continuación se sintetizan parámetros relevantes para la producción de hidrógeno mediante la fermentación oscura, así como también una breve revisión de trabajos realizados en cada uno de los parámetros descritos.

#### 1.5. PARÁMETROS OPERATIVOS PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO MEDIANTE FERMENTACIÓN OSCURA

Es ampliamente conocido que los factores más importantes que afectan el proceso de fermentación, son el pH, la temperatura, tipo de inóculo, el tiempo de retención hidráulica (TRH) y la concentración del



sustrato (Rezania et al. 2017; Stamatelatou et al. 2014). Las referencias consultadas constantemente mencionan que los distintos parámetros deben estar dentro de un intervalo concreto para mantener una producción de hidrógeno elevada (Tabla 3).

Tabla 3. Rangos de distintos parámetros utilizados para la producción de hidrógeno por fermentación oscura.

Parámetro	Rango	Sustrato	Referencias
pH	4.5-6.0	Vinazas tequileras; aguas residuales	(Buitrón & Carvajal, 2010; Lin et al., 2012)
TRH	6-12 h	Vinazas de la caña de azúcar; vinazas tequileras;	(González & Durán, 2014; Buitrón & Carvajal, 2010; Buitrón, 2014)
Temperatura <sup>a</sup>	35-37°C	Vinaza de la caña de azúcar; Vinazas tequileras	(Lazaro et al., 2014; Buitrón et al., 2014; Buitrón & Carvajal, 2010)
TCO	30-125 g DQO/L-d	Glucosa; aceites de palma, vinazas de caña de azúcar, aguas residuales	( Ferraz-Júnior et al., 2014; Krishnan et al., 2016; Shen et al., 2009)

<sup>a</sup>En un proceso mesofílico

### 1.5.1 pH

El pH es crucial debido a que influye en la actividad de las bacterias productoras de hidrógeno (BPH), afectando la actividad enzimática de la hidrogenasa y sus rutas metabólicas (Blanco, 2013). Durante la fermentación oscura es necesario evitar el incremento de ácidos no disociados, debido a que los iones  $H^+$  pueden pasar a través de la membrana de las bacterias causando un colapso en el gradiente de pH, ocasionando un cambio en la ruta metabólica de las células hacia la generación de solventes y aumentando la probabilidad de lisis celular (Bedoya et al., 2007; Stamatelatou et al., 2014). Típicamente, los valores máximos en rendimiento y tasa de producción de hidrógeno (TPH) son obtenidos cuando el pH está en un rango de 4.5 y 6.0 (Lin et al. 2012).

### 1.5.2 Tasa de carga orgánica (TCO)

La velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) es dependiente de la TCO, determinada por la concentración del sustrato o el tiempo de retención hidráulica (TRH). No obstante, al incrementar la TCO existe la posibilidad de inhibir la producción de hidrógeno por incrementar la concentración de compuesto inhibitorio emergente (Lin et al., 2012). Sin embargo, si lo que nos interesa es obtener un alto rendimiento, se debe operar a una carga orgánica elevada (Lay et al. 2010). Buitrón et al. (2014) estudiaron la influencia del TRH y concentración de DQO en la producción de hidrógeno a partir de vinazas tequileras empleando un SBR, probando TRH de 6 y 18 h y concentraciones de 2 a 16 g DQO/L, observando un mayor rendimiento trabajando con una TCO = 64 g DQO/L-d (16 g DQO/L y TRH de 6 h), con una máxima tasa de producción específica de hidrógeno (TPEH) de  $38 \pm 2$  mL  $H_2$ /g SSV-h. El aumento en la concentración del sustrato no tuvo ningún efecto sobre la TPEH. Además, la disminución del TRH ayuda a controlar la proliferación de rutas adversas como la metanogénesis, debido a que se promueve al lavado celular de metanógenos que tienen una tasa de crecimiento inferior a la de las bacterias productoras de hidrógeno y por lo tanto no cuentan con el tiempo necesario para crecer, lo que permite la selección de las BPH (Bedoya et al., 2007).

### 1.5.3 Temperatura

La BPH son capaces de producir hidrógeno que van desde 15 hasta 85°C (Blanco Londoño 2013). Las variaciones en la temperatura incluso de algunos grados afectan casi toda la actividad biológica incluyendo la inhibición de algunas bacterias anaerobias, especialmente microorganismos metanogénicos (Vinet and Zhedanov 2010). Según el régimen de los cultivos microbianos para la producción de hidrógeno con respecto a la temperatura, debe ser regulada a 0-20 °C para bacterias psicrófilas, 20-42 °C para bacterias mesofílicas y 42-75 °C para bacterias termofílicas, 65-80 °C para termofílicas extremas y >80 °C para hipertermofílicas. Cabe considerar que trabajando en condiciones termofílicas aumentan los costos en la producción de hidrógeno, debido a que existe un mayor gasto energético (Lee et al., 2011; Rezanía et al., 2017). Con base en lo anterior, Lazaro et al., (2014) evaluaron el efecto de la temperatura para la producción de hidrógeno a partir de vinazas de caña de azúcar a una concentración de 7 g DQO/L, observando un rendimiento de 49.9 y 13.21 mL H<sub>2</sub>/g DQO trabajando en mesofilia (37 °C) y termofilia (55 °C) respectivamente, concluyendo se logra un mejor rendimiento de hidrógeno en condiciones mesofílicas.

### 1.5.4 Inóculo

La producción de hidrógeno se puede llevar a cabo por cultivos puros o por con una gran variedad de microorganismos, como consorcios microbianos que por lo general provienen de lodos anaerobios. Ambos tipos de cultivos sirven como inóculos para la fermentación oscura (Bedoya et al. 2007).

#### 1.5.4.1 Cultivos puros

Diversos cultivos puros han sido ampliamente utilizados para producir hidrógeno usando una gran variedad de sustratos (Sinha and Pandey 2011). Dentro de los microorganismos anaerobios estrictos se encuentra *Clostridium spp.*, tal como *C. butyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. thermolacticum*, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. pasteurianum* etc. Estos han demostrado ser altamente eficientes en la conversión de carbohidratos a ácido acético, butírico, hidrógeno, dióxido de carbono y solventes orgánicos. Con respecto a los anaerobios facultativos, los cuales son microorganismos que presentan resistencia a la presencia de oxígeno y tienen la ventaja de consumir oxígeno garantizando condiciones anaerobias, se encuentran *Enterobacter*, *Escherichia coli* y *Citrobacter*. A pesar que las bacterias del género *Enterobacter* no presentan una inhibición a altas presiones de hidrógeno, generalmente tienen rendimientos más bajos que *Clostridium*, debido a que produce otros subproductos propios del metabolismo del hidrógeno como el ácido láctico (Bedoya et al. 2007). Es importante considerar, que las aguas residuales contienen una gran cantidad de microorganismos, los cuales pudieran competir con el inóculo puro por las fuentes de carbono o incluso inhibir su crecimiento (Bedoya et al. 2007; Lin et al. 2012). Además, es necesario mantener condiciones estériles, o al menos que el microorganismo se adapte a proliferar en condiciones no estériles (Lee et al., 2011).

#### 1.5.4.2 Consorcios microbianos

Por otra parte, los consorcios microbianos se han utilizado en diversas ocasiones para producir hidrógeno a partir de aguas residuales; debido a su diversidad, son capaces de adaptarse a una variedad de fuentes de sustrato y nutrientes. El inóculo puede ser obtenido en una amplia variedad de fuentes, incluso desde el suelo. Además, las BPH como el género *Clostridium*, son capaces de esporular a altas temperaturas, pudiéndose seleccionar las BPH mediante un tratamiento térmico, excluyendo así microorganismos metanogénicos que pudieran disminuir la producción de hidrógeno (Lin et al. 2012;

Searmsirimongkol et al. 2011) Una de las principales ventajas de los consorcios microbianos respecto a los cultivos puros, es que estos últimos son más sensibles a la contaminación de bacterias consumidoras de hidrógeno. Se ha reportado la utilización de cultivos mixtos con lodos activados, lodos digeridos anaeróbicamente, compost de desechos, sedimentos de lagos y suelos de cultivos agrícolas; muestran rendimientos cercanos a 2 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa, demostrando la presencia dominante de *Clostridium* en los cultivos enriquecidos por tratamientos o acondicionamiento de estos inóculos. Las fermentaciones de hidrógeno por cultivos mixtos muestran VVPH alrededor de 672-1120 mL H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>-h (Bedoya et al. 2007). Una desventaja de los consorcios microbianos, es que pudieran contener microorganismos capaces de competir por el sustrato, inclusive aún después de un tratamiento térmico (Sinha and Pandey 2011).

## 1.6 COMPUESTOS Y ELEMENTOS INHIBITORIOS

En la literatura se encuentran distintos rangos y concentraciones consideradas como inhibitorias en los procesos de digestión anaerobia y fermentación oscura (Tabla 4). En este sentido, característicamente, los efluentes de la industria vitivinícola contienen compuestos (principalmente elementos trazas) como fenoles (83 mg/L), fosfatos (1500 mg/L), hierro (0.3 µg/L), potasio (1480 mg/L), magnesio (99 mg/L), calcio (88.9 mg/L), sodio (20.7 mg/L), que por su concentración no resulta desfavorable. Sin embargo, su concentración de etanol es casi 3 veces mayor (105 g/L) a la concentración de inhibición reportada (Mejía-Saucedo 2018); por lo que es importante conocer su efecto en la fermentación oscura y si es posible producir hidrógeno de manera continua teniendo el etanol presente en el sustrato.

### 1.6.1 Etanol

El etanol es capaz de dañar y desnaturalizar las moléculas biológicas, alterando la capacidad funcional de las membranas celulares y lisis celular. Conjuntamente, suprime el crecimiento celular, la formación de biomasa y la producción de hidrógeno (Nicolaou et al., 2010). En este sentido, Wang et al., (2008), evaluaron el efecto inhibitorio del etanol, de 0 a 13.8 g/L, en la producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura, empleando glucosa como sustrato y utilizando un cultivo mixto. Observaron una disminución gradual en la producción de hidrógeno acumulado conforme se iba aumentando la concentración de etanol, obteniendo que para la concentración de 13.8 g/L el hidrógeno acumulado disminuyó un 54% con respecto a la condición sin etanol. De manera similar, Tang et al. (2012) evaluaron los efectos del etanol en la fermentación oscura para la producción de hidrógeno empleando una cultivo puro *Ethanoligenens harbinense B49*; encontrando que a concentraciones de etanol de 0 a 9.2 g/L disminuyó la TPEH de 723 a 332 mL H<sub>2</sub>/g<sub>biomasa</sub>-h, además de disminuir el consumo de sustrato en un 32%.

Cabe destacar que ambos trabajos no emplearon concentraciones mayores a 9.2 y 13.8 g/L, considerando que los efluentes vitivinícolas contienen una concentración de etanol de 105 g/L, por lo cual es muy probable que exista una clara inhibición en la fermentación oscura. En este sentido, Albarrán-Contreras (2017) empleó un sistema en lote y uno en continuo alimentado con efluentes de la industria del vino blanco para la producción de hidrógeno. Inicialmente en el experimento en lote, obtuvo una producción acumulada de 155 mL H<sub>2</sub> con una concentración de etanol de 11 g/L, mencionando que en concentraciones superiores (22, 33, 44 y 55 g/L) disminuyó la producción de hidrógeno hasta el punto de ser nula, debido a la concentración de etanol y que llega a ser inhibitoria para el inóculo. Posteriormente, operó un sistema en continuo empleando un reactor anaerobio de lecho fluidizado (UASB por sus siglas en inglés “*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*”), a una TCO de 218 g

DQO/L-d y una concentración de etanol de 12 g/L, alcanzó una máxima VVPH de 44 mL H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>-h. No obstante, a pesar de utilizar las mejores condiciones para la producción de hidrógeno en un sistema en lote (concentración de etanol de 11 g/L), no aumentaron la TCO aun cuando existen antecedentes que los sistemas de biomasa fija soportan altas concentraciones de compuestos inhibitorios (Fernandes et al. 2013). En este sentido, Mejía-Saucedo (2018) empleando un reactor anaerobio de lecho fijo (APBR por sus siglas en inglés “*Anaerobic Packed Bed Reactor*”) a una TCO de 523 g DQO/L-d y una concentración de etanol de 52 g/L, obtuvo una VVPH de 56.2 mL H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>-h a partir de efluentes de la industria del vino tinto, viéndose que la aclimatación de los microorganismos en la biopelícula favoreció el aumento de la producción de hidrógeno, a pesar de operar 2 y 4 veces mayor en la TCO y concentración de etanol respectivamente en comparación con Albarrán-Contreras (2017).

Tabla 4. Compuestos con rangos óptimos e inhibitorios reportados para la digestión anaerobia y fermentación oscura

Compuestos	Concentración o rango ideal (mg/L)	Concentración de inhibición (mg/L)	Concentración en efluentes vitivinícolas (mg/L)	Efectos inhibitorios	Referencias
Magnesio	100 <sup>fo</sup>	> 800 <sup>fo</sup>	99	Inhibición de la glucólisis	(Mejía-Saucedo, 2018; Alshiya et al., 2008; Zhao et al., 2012)
Sodio	5003-14410 <sup>fo</sup>	> 20000 <sup>a</sup>	21	Bajo crecimiento celular y baja producción de hidrógeno	(Mejía-Saucedo, 2018; Cao & Zhao, 2009; Parkin & Owen, 1986)
Calcio	75-150 <sup>fo</sup>	> 300 <sup>fo</sup>	89	Disminución del rendimiento para la producción de hidrógeno	(Mejía-Saucedo, 2018; Wu, Chu, & Shen, 2012;)
Potasio	100-400 <sup>a</sup>	>2500 <sup>a</sup>	1480	Inhibición de bacterias anaerobias	(Mejía-Saucedo, 2018; Vinet & Zhedanov, 2010; Parkin & Owen, 1986)
Hierro	10.9-13.7 <sup>fo</sup>	>21.9 <sup>fo</sup>	3x10 <sup>-4</sup>	Baja la actividad de la enzima hidrogenasa	(Mejía-Saucedo, 2018; Lee et al., 2009)
Fosfatos	15700	>62800	1500	Inhibición del crecimiento celular	(Albarrán, 2017; Xu, Mi, & Ren, 2016)
Compuestos fenólicos	200-400 <sup>fo</sup>	>1000 <sup>fo</sup>	83	Dañan la membrana celular	(Mejía-Saucedo, 2018; Tai et al., 2010)
Etanol	ND	37700 <sup>fo</sup>	105000	Suprime el crecimiento celular, la formación de biomasa y la producción de hidrógeno	(Mejía-Saucedo 2018; Wang et al. 2008)

ND -No determinado

<sup>a</sup> - Digestión anaerobia

<sup>fo</sup> - Fermentación oscura

## 1.7 INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

Aunque se han identificado el rango de concentraciones inhibitorias para varios compuestos mostradas en la Tabla 4, son pocos los trabajos que desarrollan modelos de inhibición que correlacionen las concentraciones del inhibidor y las tasas de productividad. En este sentido, las tasas de consumo de sustrato y crecimiento microbiano pueden disminuir por la presencia de compuestos y elementos inhibitorios que influyen en la actividad enzimática. Algunos compuestos en altas concentraciones, como etanol, magnesio, potasio y hierro afectan directamente en la función de las enzimas. En ciertos casos, pueden afectar una única enzima encargada del consumo del sustrato o algunas funciones

celulares, o bien, pudiera ocasionar reacciones con el objetivo de que la célula intenta compensar los impactos negativos del inhibidor, reduciendo el flujo de electrones ocasionando una pérdida de biomasa o disminuyendo la velocidad de otras reacciones que requieren electrones. La inhibición enzimática se puede dividir en dos tipos de inhibición; reversible e irreversible, dependiendo si existe una unión con el centro activo de forma no covalente (temporalmente) o covalente (permanente), respectivamente (Nelson & Cox, 2011; Rittmann & McCarty, 2001).

### 1.7.1 Inhibición reversible

La inhibición reversible se caracteriza por la rápida disociación del complejo enzima-sustrato (ES), donde se pueden identificar tres tipos principales: inhibidor competitivo, acompetitivo y mixto (Tymoczko et al., 2014). Un inhibidor competitivo, compite con el sustrato por el sitio activo de la enzima, impidiendo su fijación. La ecuación 3 se utiliza para determinar la velocidad inicial ( $V_0$ ) en presencia de un inhibidor competitivo, donde  $V_{m\acute{a}x}$  es la velocidad inicial máxima de la reacción catalizada,  $[S]$  es la concentración de sustrato presente,  $K_m$  es la constante de Michaelis-Menten,  $[I]$  es la concentración del inhibidor,  $K_I$  es la constante de equilibrio para la fijación del inhibidor (que se define por la ecuación 4, donde  $[E]$  es la concentración de la enzima y  $[EI]$  es la concentración del complejo enzima-inhibidor).

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]} \quad \text{Ec. 3}$$

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad \text{Ec. 4}$$

Por lo tanto, al ser una inhibición reversible y competitiva, se puede cambiar el sentido de la competición en favor del sustrato simplemente con la adición de más sustrato (Nelson & Cox, 2011; Tymoczko et al., 2014).

Por otra parte, un inhibidor acompetitivo se fija a un sitio distinto al que se fija el sustrato y a diferencia del inhibidor competitivo, solo se une al complejo ES. Este tipo de inhibidor actúa cuando una enzima tiene dos sitios: el sitio activo y otro conocido como sitio alostérico. Cuando el inhibidor se une a la enzima en el sitio alostérico, ocasiona una inactivación de la misma, debido a la modificación de su forma, de modo que el sustrato no puede unirse al sitio activo. Sin embargo, es posible que el inhibidor y el sustrato se unan simultáneamente, en este caso, la presencia del inhibidor afectará su consumo (Tymoczko et al., 2014). La ecuación 5 se emplea cuando existe la presencia de un inhibidor acompetitivo.

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_I'}\right)} \quad \text{Ec. 5}$$

$$K_I' = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad \text{Ec. 6}$$

Donde  $K_I'$  se define por la siguiente ecuación (Ec. 6), donde [ESI] es la concentración del complejo enzima-sustrato-inhibidor: La ecuación 5 nos describe que a una elevada concentración de sustrato,  $V_0$  se aproxima a  $\frac{V_{m\acute{a}x}}{1+\frac{[I]}{K_I'}}$ . La  $K_m$  aparentemente también disminuye, debido a que la [S] necesaria para

alcanzar la mitad de la  $V_{m\acute{a}x}$  disminuye con el factor  $\left(1 + \frac{[I]}{K_I'}\right)$  (Nelson and Cox 2011).

Un inhibidor mixto también se fija a un sitio distinto al del sustrato, pero se fija tanto a E como a ES. La ecuación 7 describe como se comporta inhibición mixta.

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_I'}\right)} \quad \text{Ec. 7}$$

Usualmente, un inhibidor mixto afecta tanto a  $K_m$  como a  $V_{m\acute{a}x}$ . En caso de que  $\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) = \left(1 + \frac{[I]}{K_I'}\right)$  entonces se definiría como una inhibición no competitiva. La ecuación 7 se utiliza como una expresión general de los efectos inhibidores reversibles, quedando simplificada a las expresiones para la inhibición competitiva y acompetitiva cuando, respectivamente,  $\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) = 1$  o  $\left(1 + \frac{[I]}{K_I'}\right) = 1$  (Nelson and Cox 2011).

Al comparar la manera en que un inhibidor afecta  $K_m$  o  $V_{m\acute{a}x}$ , se puede determinar si el inhibidor es competitivo o acompetitivo. Sin embargo, cuanto la inhibición es mixta, a veces la determinación de la naturaleza de la inhibición es compleja (Rittmann and McCarty 2001).

### 1.7.2 Inhibición irreversible

Los inhibidores irreversibles la causan agentes llamados inhibidores enzimáticos irreversibles, que generalmente son sustancias tóxicas, naturales o sintéticas que dañan a las enzimas. El inhibidor se combina con algún grupo funcional del sitio activo de la enzima, forma un enlace covalente y la deja, catalíticamente inactiva, o la destruye en forma permanente. Hay una gran variedad de “venenos” enzimáticos como: los iones de metales pesados ( $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$ ), agentes oxidantes, entre otros, que inactivan la enzima en forma permanente o cuando mucho, se reactiva muy lentamente (Tymoczko et al., 2014).

### 1.7.3 Modelos de inhibición

Existen modelos cinéticos que se han utilizado para explicar cuantitativamente los efectos de los compuestos inhibitorios en la producción de hidrógeno. Asimismo, las constantes obtenidas proporcionan información útil para el análisis, diseño y operación del proceso, permitiendo la estimación del valor de interés. Hasta ahora, algunos modelos cinéticos han sido propuestos para describir los efectos inhibitorios de concentraciones de compuestos producidos durante la producción de hidrógeno fermentativo en modo discontinuo. Entre ellos se encuentra el modelo modificado Han-Levenspiel que ha sido ampliamente usado (Ec. 8) para estudiar el efecto inhibitorio de compuestos producidos durante la fermentación oscura como el ácido acético, ácido butírico, ácido propiónico y

etanol en la TPH (Tang et al. 2012; Wang and Wan 2009; Wang et al. 2008; Zheng and Yu 2005).

$$R = \frac{R_{\max}}{1 + \left(\frac{C}{K_c}\right)^m} \quad \text{Ec. 8}$$

Como se muestra en la Figura 2, el valor de la tasa de producción (R) va disminuyendo con respecto a la máxima producción de hidrógeno sin agregar inhibidores ( $R_{\max}$ ) conforme se incrementa la concentración inhibitoria (C) desde cero a la concentración crítica ( $C_{\text{crit}}$ ) (Wang & Wan, 2009).

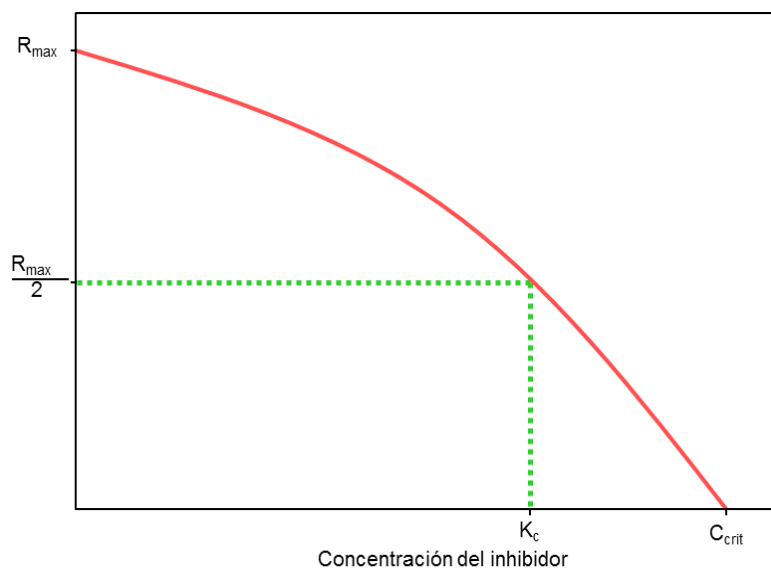


Figura 2. Curva del modelo modificado de Han-Levenspiel

Wang et al., (2008), describieron los efectos inhibitorios no competitivo de diferentes concentraciones de etanol sobre tasas específicas de degradación de glucosa y la producción de hidrógeno en pruebas en lote, evaluando el grado de inhibición utilizando la Ec. 9.

$$R = R_{\max} \left(1 - \frac{C}{C_{\text{crit}}}\right)^m \quad \text{Ec. 9}$$

Donde R es la tasa específica de degradación de glucosa o producción de hidrógeno (mg/gSSV-h o mL/gSSV-h), C es la concentración de etanol,  $C_{\text{max}}$  es la concentración la cual cesa la producción de hidrógeno y m el exponente de la inhibición. Probaron un cultivo mixto en un rango de concentraciones de etanol de 0 a 13.8 g/L, donde el consumo de glucosa y el rendimiento  $Y_x/s$  disminuyeron 4 y 56%, respectivamente, en la concentración más alta a diferencia de la más baja; así mismo dichos resultados se ajustaron al modelo de Han-Levenspiel modificado para obtener la concentración máxima a la que cesa la producción de hidrógeno de 37.7 g/L de etanol.

Liu et al. (2009), usando la Ec. 10 describieron los efectos inhibitorios de las concentraciones de butirato en las tasas específicas de crecimiento entre *Clostridium tyrobutyricum* silvestre y su mutación, siguiendo una cinética de inhibición no competitiva con diferentes constantes de velocidad de inhibición.

$$R = \frac{R_{\max} K_c}{K_c + C} \quad \text{Ec. 10}$$

Tang et al. (2012), investigaron los efectos inhibidores de acetato (0-9 g/L) y de etanol (0-9.2 g/L) sobre la degradación de la glucosa, el crecimiento celular y la producción de hidrógeno, utilizando *Ethanoligenens harbinense B4* como cepa. Los efectos inhibitorios del acetato y el etanol se compararon y analizaron sobre la base del modelo modificado de inhibición de Han-Levenspiel (Ec. 8), para lograr la cuantificación precisa del grado en el que el acetato y el etanol afectan la producción de hidrógeno. Obteniendo para la adición del acetato, una tasa máxima de producción específica de hidrógeno  $R_{\max} = 722 \text{ mL H}_2/\text{gSVV-h}$  y una constante de inhibición  $K_c = 8.3 \text{ g/L}$  y su exponente de inhibición  $m=0.6$ . Mientras para la adición del etanol se obtuvo una  $R_{\max} = 729 \text{ mL H}_2/\text{gSVV-h}$ ,  $K_c = 6.4 \text{ g/L}$  y  $m=0.8$ . Concluyendo que el modelo de inhibición no competitivo se utilizó con éxito para describir los efectos inhibitorios de acetato y etanol.

A pesar de que existen varios estudios empleando el modelo modificado de Han-Levenspiel, se ha obtenido una  $K_c$  para el etanol utilizando un cultivo puro (Tang et al. 2012); mientras empleando un cultivo mixto, se ha determinado una  $C_{\text{crit}}$  pero dentro de un rango de concentración baja, reflejando una disminución del 43% en la producción de hidrógeno, lo que pudiera subestimar la concentración inhibitoria del etanol (Wang et al. 2008).

Tabla 5. Modelos utilizados para metabolitos de la fermentación de inhibición para el etanol

Sustrato	Inóculo	Modelo utilizado	Rango de concentración (g/L)	Valor del parámetro de inhibición (g/L)	Reducción del potencial de hidrógeno	Referencia
Glucosa	<i>Ethanoligenens harbinense B4</i>	$R = \frac{R_{\max}}{1 + \left(\frac{C}{K_c}\right)^m}$	0-9.2	$K_c=6.4$	54%	(Tang et al. 2012)
Glucosa	Cultivo mixto	$R = R_{\max} \left(1 - \frac{C}{C_{\text{crit}}}\right)^m$	0-13.8	$C_{\text{crit}}=37.7$	57%	(Wang et al., 2008)

### 1.8 TIPO DE BIORREACTOR

Existen diferentes configuraciones de reactores que han sido empleados para la producción de hidrógeno, tal como los sistemas de biomasa fija como los UASB (Zhao et al., 2008), reactores tipo lecho percolador (TBR, por sus siglas en inglés “*Trickle Bed Reactor*”) (Arreola-Vargas et al. 2015), (Buitrón et al., 2014), reactores anaerobios de lecho fijo (APBR por sus siglas en inglés “*Anaerobic Packed Bed Reactor*”) (Peixoto et al., 2011) y reactores de lecho fluidizado (AFBR por sus siglas en inglés “*Anaerobic Fluidized Bed Reactor*”) (Amorim et al., 2009); y sistemas de biomasa suspendida como, reactores continuos de tanque agitado (CSTR por sus siglas en inglés “*Continuous Stirred-Tank Reactor*”) (Ren et al., 2010) y reactores discontinuos secuenciales (SBR por sus siglas en inglés “*Sequencing Batch Reactor*”) Sin embargo, los reactores de biomasa suspendida tienen la desventaja



de que cuando se operan a TRH relativamente bajos, el lavado de biomasa se hace inevitable. Por otro lado, los sistemas de biomasa fija se caracterizan por la inmovilización celular, que conlleva a una alta concentración de microorganismos inclusive a TRH bajos (Jeon et al. 2008).

En la Tabla 6 se muestran diferentes tipos de reactores para la producción de hidrógeno con sustratos similares a los efluentes de la industria vitivinícola, observando que Buitrón et al., (2014) y Mejía-Saucedo (2018) obtuvieron las mejores tasas máximas de producción de hidrógeno, obteniendo 72.0 y 56.2 mL H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>-h respectivamente, utilizando reactores anaerobios de biomasa fija.

Por sus altas VVPH y TRH bajos de operación, en el siguiente apartado se discutirán solamente los biorreactores anaerobios de biomasa fija, debido a que se han probado con éxito para la producción de hidrógeno a partir de efluentes agroindustriales. Estos reactores permiten emplear altas TCO, se necesitan bajos requerimientos energía y son más resistentes a compuestos inhibitorios en comparación con los sistemas de biomasa suspendida (Fernandes et al., 2013).

Tabla 6. Reactores para la producción de hidrógeno a partir de efluentes vitivinícolas o sustratos con características similares

Sustrato	Tipo de reactor	Inóculo	Máxima VVPH <sup>a</sup> (mL H <sub>2</sub> /L <sub>reactor</sub> -h)	Rendimiento (mL H <sub>2</sub> /g DQO)	Referencias
Vinazas tequileras	APBR	Lodo anaerobio granular	72.0	30.9	(Buitrón, Prato-Garcia, et al. 2014)
Vinazas tequileras	SBR	Lodo anaerobio	27.7	190	(Buitrón et al., 2014)
Vinazas tequileras	SBR	Lodo anaerobio granular	50.5	201.6	(Buitrón and Carvajal 2010)
Vinazas de caña de azúcar	UASB	Lodo anaerobio	13.4	8.4	(González and Durán 2014)
Efluentes vitivinícolas	APBR	Lodo anaerobio	56.2	2.5	(Mejía-Saucedo 2018)
Efluentes vitivinícolas	UASB	Lodo anaerobio granular	44.0	5.0	(Albarrán-Contreras 2017)

APBR - Anaerobic Packed Bed Reactor

SBR – Sequencing Batch Reactor

UASB – Upflow Anaerobic Sludge Blanket

VVPH – Velocidad Volumétrica de Producción de Hidrógeno

### 1.8.1 Reactores anaerobios de biomasa fija

En la fermentación oscura además de buscar efluentes con alta concentración de materia orgánica, se contempla retener el mayor tiempo posible las BPH con el fin de aumentar su biomasa y operar altas TCO con el propósito de incrementar la producción de hidrógeno (Bedoya et al., 2007; Muri et al., 2017). Como se mencionó anteriormente en la sección 1.1, los efluentes vitivinícolas disponen de una alta concentración de DQO, por lo que el sistema destinado a su uso para la producción de hidrógeno deberá de soportar altas TCO a los TRH típicos (Tabla 3). Además, operar altas TCO disminuye la probabilidad de encontrar actividad metanogénica (Krishnan et al. 2016). Aunado a esto, existen trabajos donde se ha evaluado el efecto de altas TCO en la producción de hidrógeno utilizando sistemas de biomasa fija utilizando vinazas o efluentes vitivinícolas. Entre los reactores destaca los APBR por operar elevadas TCO con sustratos complejos como son las vinazas o efluentes vitivinícolas (Tabla 7). Además, se han obtenido mejores VVPH cuando operaran altas TCO. Por ejemplo Ferraz

Júnior et al., (2014), obtuvieron una máxima VVPH de 42.6 mL H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>-h a una TCO de 72.4 g DQO/L-d. Mejía-Saucedo, (2018) a una TCO de 523 g DQO/L-d alcanzó una máxima VVPH de 56.2 mL H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>-h. Por lo anterior, existe el interés de utilizar un reactor anaerobio con lecho empacado debido a su capacidad de soportar altas concentraciones de carga orgánica. Entre ellos se encuentran los TBR; que a diferencia del APBR, los soportes donde se forma la biopelícula no se encuentran inundados, sino que el sustrato escurre por los soportes promoviendo así altas tasas de transferencia de biogás desde la biopelícula, debido a la formación de una capa delgada de líquido que facilita la liberación del hidrógeno desde el empaque (Arreola-Vargas et al., 2015; Van Groenestijn et al., 2009). Además, debido a su eficiencia y estabilidad en la producción de hidrógeno, se ha realizado un experimento para la generación de electricidad, acoplado una celda de combustible al TBR alimentado con sucrosa (Jeon et al. 2008).

Tabla 7. Trabajos donde evaluaron el efecto de la TCO en reactores de biomasa fija

Sustrato	Tipo de reactor	TRH (h)	Rango de operación de TCO (g DQO/L-d)	Máxima VVPH (mL H <sub>2</sub> /L <sub>reactor</sub> -h)	TCO óptima (g DQO/L-d)	Referencias
Vinaza de caña de azúcar	APBR	8-24	36-108.6	42.6	72.4	(Ferraz Júnior et al., 2014)
Vinazas del etanol	UASB	6-12	40-80	13.4	80	(González and Durán 2014)
Efluentes vitivinícolas	APBR	5.5	148-523	56.2	523	(Mejía-Saucedo 2018)
Glucosa	TBR	3-12	10-160	840	160	(Arreola-Vargas et al. 2015)
Glucosa	TBR	4-12	29- 175	631	131	(Oh et al. 2004)

APBR - Anaerobic Packed Bed Reactor

TBR - Trickle Bed Reactor

UASB - Upflow Anaerobic Sludge Blanket

VVPH - Velocidad Volumétrica de Producción de Hidrógeno

En la literatura existen trabajos que han empleado el TBR para la producción de hidrógeno, por ejemplo, Arreola-Vargas et al., (2015), evaluaron distintas TCO empleando glucosa como sustrato alcanzando una máxima VVPH de 840 mL/L<sub>reactor</sub>-h operando a una TCO de 160 g DQO/L-d a un TRH de 3 h, destacando de obtener la máxima VVPH a la mayor TCO de operando, sin observar taponamiento por el crecimiento excesivo de la biomasa en los soportes. Mientras que Oh et al., (2004), estudiaron el efecto de la TCO variando el TRH y la concentración de glucosa en un reactor termofílico, reportaron una máxima VVPH de a una TCO de 131.7 g DQO/L-d y TRH de 4 h, obtuvieron una máxima VVPH de 631 mL/L<sub>reactor</sub>-h. Demostrando que los reactores TBR son capaces de operar altas TCO y TRH relativamente bajos en la producción de hidrógeno, existiendo el interés de evaluar diferentes TCO pero empleando un sustrato real (efluentes vitivinícolas).

Otros de los sistemas de biomasa fija de interés son los sistemas granulares, caracterizados por retener la mayoría de los lodos dispersos y floculados en la parte inferior del reactor. Entre los sistemas granulares comúnmente utilizados se encuentran los reactores UASB, debido a que presentan ventajas como bajo costos de construcción, baja probabilidad de lavado de gránulos y son capaces de tratar efluentes con alta cantidad de materia orgánica recalcitrante, tales como vinazas y efluentes vitivinícolas (Lim and Kim 2014). En este sentido, González & Durán, (2014) empleando vinazas de la caña de azúcar obtuvieron un máxima VVPH de 13.4 mL H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>-h a una TCO de 80 g DQO/L-d y TRH de 6 h. Sin embargo, a pesar de que evaluaron a la máxima TCO de operación en la producción

de hidrógeno, no observaron un decrecimiento en la productividad. Mientras Albarrán-Contreras, (2017), utilizando efluentes vitivinícolas a una TCO de 218 g DQO/L-d y un TRH de 5.5 h, alcanzó una máxima VVPH de 44 mL H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>-h. En este estudio no se realizó un aumento en la TCO, por lo que es necesario evaluar su efecto en la producción de hidrógeno operando por encima del valor estudiado. Además, los efluentes de la industria vitivinícola tienen un parámetro característico, el alto contenido de etanol, que al ser considerado un compuesto inhibitorio, pudieran disminuir la producción de hidrógeno, por lo que una solución para hacer frente a la elevada concentración del inhibidor, es utilizar sistemas de biomasa fija, principalmente granulares y biopelícula, que han sido demostrados de tener la capacidad de soportar altas TCO.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El aumento en el uso de los combustibles fósiles han causado problemas alrededor del mundo, de manera que ha contribuido considerablemente a la contaminación ambiental y calentamiento global del planeta (Mutturi et al., 2014). Un combustible prometedor para encarar el problema es el hidrógeno, considerado un recurso limpio debido a que durante su combustión se produce únicamente agua como producto; y poseer un mayor contenido de energía por unidad de peso (122-144 kJ/g) comparado con los combustibles fósiles (Andr et al. 2012). Existen diversos métodos para la obtención del hidrógeno, pero el más propicio y más amigable con el ambiente es la fermentación oscura, debido a que se puede producir hidrógeno a partir de un residuo o efluente orgánico mediante un proceso biológico (Liu 2008).

En México, el incremento en la producción de vino ha aumentado las descargas de aguas residuales; se considera que por cada litro producido de vino, se generan entre 0.7 a 1.2 L de efluentes vitivinícolas (Consejo Mexicano de Vitivinícola, 2017; Andreottola et al., 2009). Dichos efluentes, cuando son descargados directamente al suelo o cuerpos de agua, pueden provocar impactos ambientales tales como la disminución de oxígeno, acidificación del suelo y eutrofización del agua (Rajagopal et al., 2014; Chapman et al. 1998). Una manera de aprovechar estos residuos es emplearlos como sustrato en el proceso de fermentación oscura. Actualmente, existen trabajos que han empleado dichos residuos en la producción de hidrógeno utilizando reactores de biomasa fija, obteniendo producciones de 44.0 mL  $H_2/L_{\text{reactor-h}}$  en un reactor UASB (Albarrán-Contreras 2017) y 56.2 mL  $H_2/L_{\text{reactor-h}}$  en un APBR (Mejía-Saucedo 2018).

Es bien sabido que utilizando un sistema de biomasa fija, presentan ventajas de bajos requerimientos de energía, son más resistentes a compuestos inhibitorios y se pueden utilizar elevadas TCO en comparación con los sistemas de biomasa suspendida (Fernandes et al., 2013). Sin embargo, en trabajos previos donde utilizaron efluentes vitivinícolas como sustratos (Albarrán-Contreras, 2017, Mejía-Saucedo, 2018), existe una baja producción de hidrógeno que se puede atribuir a la alta concentración de etanol, que pudiera inhibir el proceso de fermentación oscura (Tang et al., 2012; Wang et al., 2008). En este sentido, es posible utilizar el modelo modificado de Han-Levenspiel para describir el efecto inhibitorio del etanol en la producción de hidrógeno en un sistema en lote, encontrando una constante de inhibición y predecir el comportamiento del sistema a diferentes concentraciones del compuesto inhibitorio (Tang et al., 2012; Wang et al., 2008).

Para la producción de hidrógeno en continuo, los reactores de biomasa fija han sido estudiados en la evaluación de diferentes TCO para la producción de hidrógeno utilizando vinazas o efluentes vitivinícolas (Ferraz Júnior et al., 2014; Buitrón et al., 2014; Buitrón & Carvajal, 2010; González & Durán, 2014; Mejía-Saucedo, 2018). En donde el incremento en la TCO aumenta la fuente de carbono a las BPH que podría incrementar la producción de hidrógeno. Un sistema común de biomasa fija son los reactores UASB, debido a que presentan bajos costos de construcción, baja probabilidad de lavado de gránulos y son capaces de tratar efluentes con alta cantidad de materia orgánica recalcitrante. Estos reactores de biomasa granular tiene la principal ventaja sobre los reactores de lecho expandido granular (EGSB) de disminuir considerablemente el lavado celular (Mohammadi et al. 2017). Mientras para el sistema de biopelícula, los TBR que se basan en crecimiento sobre biopelícula, al no se encuentran inundados presentan la ventaja de obtener altas tasas de transferencia de biogás desde la biopelícula,

debido a la formación de una delgada capa de líquido que facilita la liberación del biogás en la biopelícula (Arreola-Vargas et al., 2015; Van Groenestijn et al., 2009).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la carga orgánica y configuración de reactor en la producción de hidrógeno en sistemas de biomasa fija, granular y biopelícula, alimentados con efluentes vitivinícolas.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la constante de inhibición por etanol en la producción de hidrógeno en sistemas en lote, utilizando glucosa como sustrato modelo.
- Evaluar el efecto de distintas cargas orgánicas y configuración de reactor en la tasa de producción de hidrógeno a partir de los efluentes vitivinícolas.
- Evaluar la dinámica de la comunidad microbiana en los diferentes sistemas y cargas orgánicas.

### **4. HIPÓTESIS**

La mejor transferencia de biogás en el reactor de biopelícula favorecerá la productividad de hidrógeno, comparado con el reactor granular, al utilizar efluentes vitivinícolas como sustrato con alta concentración de etanol.

## 5. METODOLOGÍA

En la Figura 3, se presenta un diagrama sistemático en donde se resumen las etapas de la metodología que se llevaron a cabo. Cada una de las etapas se describe detalladamente en los siguientes apartados.

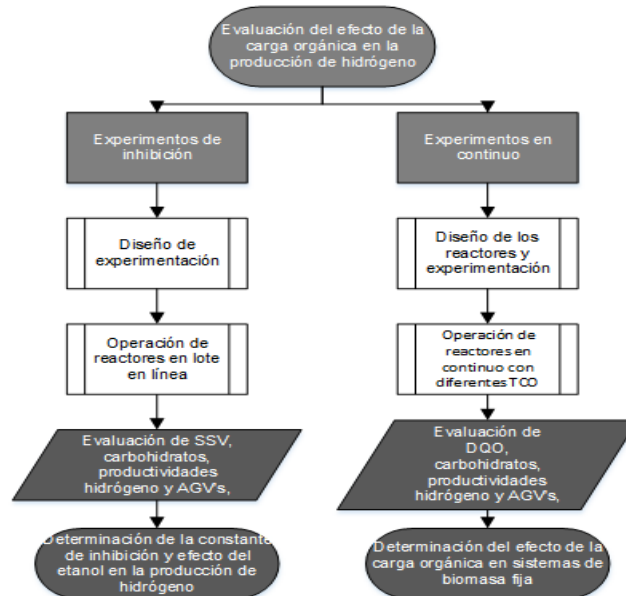


Figura 3. Diagrama de cada una de las etapas que se realizaron en el proyecto

### 5.1 EXPERIMENTOS DE INHIBICIÓN

Se estudió el efecto de distintas concentraciones de etanol en la fermentación oscura empleando glucosa como sustrato y un cultivo mixto como inóculo; evaluando la producción de hidrógeno, tiempo de latencia, consumo de carbohidratos, crecimiento de biomasa, metabolitos producidos y dinámica de la comunidad bacteriana. Utilizando el modelo modificado de Han-Levenspiel, se logró obtener una constante de inhibición con el propósito de predecir su efecto en la actividad hidrogenogénica.

#### 5.1.1 Inóculo

Se utilizó como inóculo un lodo termófilo proveniente de un digestor anaerobio de lodos activados de una planta tratadora de aguas municipales de la ciudad de Santiago de Querétaro, Querétaro. La viabilidad de dicho inóculo ya había sido probado exitosamente para la producción de hidrógeno a partir de efluentes vitivinícolas (Mejía-Saucedo 2018). El lodo se le dio un tratamiento térmico a una temperatura de 105 °C durante 24 h, con el objetivo de eliminar los microorganismos metanogénicos consumidores de hidrógeno y enriquecer los microorganismos productores de hidrógeno con capacidad de esporular (Moreno-Andrade et al., 2015). Posteriormente, el lodo se homogenizó en un molino eléctrico y se tamizó a un tamaño de malla de 200  $\mu\text{m}$ . El lodo tratado se conservó en una bolsa hermética a temperatura ambiente hasta su uso.

#### 5.1.2 Medio mineral

Como fuente de nutrientes y medio regulador, se preparó una solución modificada descrita por Mizuno et al. (2000), en donde cada litro de solución contenía: 41.6 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 4 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1.6 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 40 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 40 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 40 mg KI, 8 mg  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 8 mg

ZnCl<sub>2</sub>.

### 5.1.3 Determinación de la constante de inhibición (K<sub>c</sub>)

La constante de inhibición se obtuvo a partir de experimentos en lote en el sistema automático AMPTS II (Bioprocess Control, Suecia) que registra las productividades de gas en línea, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Figura 4). El volumen total y de trabajo de las botellas fueron de 600 mL y 450 mL, respectivamente. Se empleó una relación sustrato/inóculo de 2.7. El sustrato utilizado fue glucosa a una concentración de 5 g/L, adicionando etanol para alcanzar diferentes concentraciones. Las concentraciones de etanol evaluadas fueron 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30 y 33 g/L. Añadiendo un control endógeno sin sustrato ni etanol. A cada botella se le agregó un volumen de 28.3 mL de medio mineral. El pH inicial se ajustó a 7.5 con NaOH 8N. Se desplazó la atmósfera de cada una de las botellas con N<sub>2</sub> durante 15 s. Los experimentos se incubaron a 37°C con una agitación intermitente de 120 rpm (60 s prendido/180 s apagado) (Carrillo-Reyes et al., 2017) Cada condición se evaluó por triplicado y al terminar las cinéticas de producción de hidrógeno, se tomaron muestras para determinar la composición del biogás, ácidos grasos volátiles (AGVs), carbohidratos solubles, sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV). Se conservaron muestras de biomasa para la caracterización de la comunidad bacteriana.

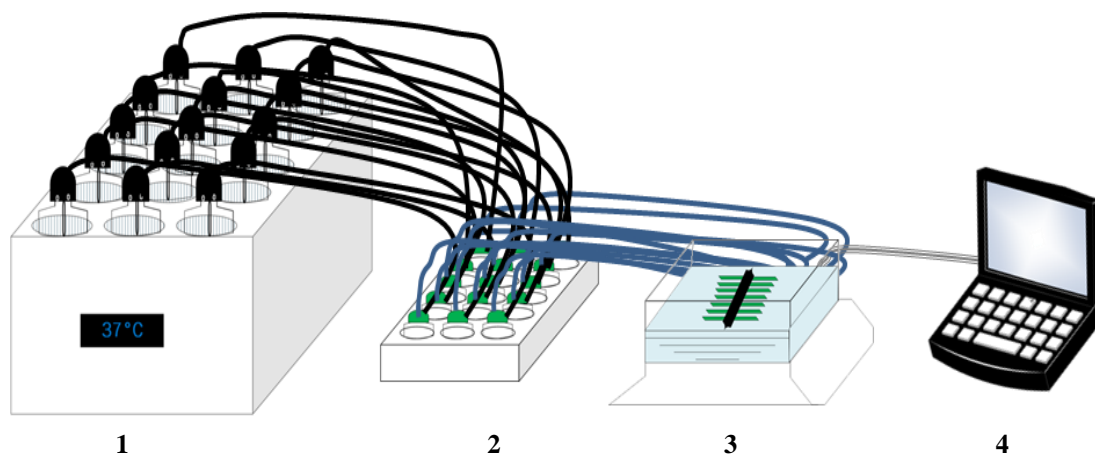


Figura 4. Sistema AMPTS II. 1- Reactores con controlador de temperatura, 2- Trampa de CO<sub>2</sub> (NaOH 3N) 3- Dispositivo de medición de volumen de gas en línea, 4-Computador

### 5.1.4 Análisis de datos y modelado

Para ajustar el modelo de inhibición se utilizó la tasa máxima de producción de hidrógeno ( $R_{\max}$ , mL H<sub>2</sub>/h) obtenida para cada condición evaluada mediante el modelo modificado de Gompertz (Ecuación 1) (Zwietering et al., 1990):

$$H(t) = H_{\max} \exp \left[ -\exp \left( \frac{2.71828 R_{\max} (\lambda - t)}{H_{\max}} + 1 \right) \right] \quad \text{Ec. 11}$$

En donde  $H(t)$  es el volumen de hidrógeno (mL) producido en el tiempo ( $t$ ),  $H_{\max}$  es la cantidad máxima acumulada de hidrógeno (mL) y  $\lambda$  es el tiempo de latencia (h). Se utilizó la herramienta Solver (Excel, Microsoft Office) para encontrar los parámetros del modelo modificado de Gompertz.



La variable  $R_{max,e}$  (mL H<sub>2</sub>/g-SSV-h) se calculó con  $R_{max}$  específica de acuerdo a la concentración final de biomasa (g SSV/L) en cada condición. Una vez obtenido los resultados de la cinética de producción de hidrógeno en el sistema en lote, se aplicó el modelo modificado de inhibición no competitiva de Han-Levenspiel, para encontrar los valores de  $K_c$  y  $n$  a partir de la actividad hidrogenogénica específica (mL H<sub>2</sub>/g SSV-h) en función de la concentración de etanol añadido (g/L), ajustando el modelo con los datos obtenidos mediante una regresión no lineal con ayuda de la herramienta MATLAB software (R2017b, MathWorks). El modelo de inhibición no competitivo que se utilizó es el siguiente:

$$R_e = \frac{R_{max,e}}{1 + \left(\frac{C}{K_c}\right)^n} \quad \text{Ec. 12}$$

Donde  $R_e$  es la actividad hidrogenogénica específica (mL H<sub>2</sub>/g-SSV-h),  $R_{max,e}$  es la máxima actividad hidrogenogénica específica (mL H<sub>2</sub>/g-SSV-h),  $C$  es la concentración de etanol utilizado (g/L),  $K_c$  es la constante de inhibición (g/L) y  $n$  es el exponente de inhibición.

Se realizaron análisis estadísticos con un 95% de confianza. Mediante un análisis de varianza (ANOVA) se examinaron las variables de respuesta en el experimento de inhibición (volumen acumulado de hidrógeno, tiempo de latencia, consumo de carbohidratos) en respuesta a un factor (diferentes concentraciones de etanol). Posteriormente, si el valor  $p$  es menor que el nivel de significancia, se utilizó el método de comparaciones múltiples de Tukey, para obtener información más detallada sobre las diferencias entre medias específicas. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software Real Statistics (2010, Real Statistics Resource).

Para un mayor comprensión entre la abundancia relativa de las OTU's (Unidades Taxonómicas Operacionales) identificadas, se realizó un dendrograma, con ayuda del paquete VEGAN, que proporciona herramientas para el análisis de diversidad, ordenación de la comunidad y análisis de disimilitud (Oksanen et al. 2016), además de una correlación de Pearson entre las distintas variables de respuesta (género de microorganismos identificado, metabolitos y producción de hidrógeno) utilizando el paquete CORRPLOT, que es una visualización gráfica de una matriz de correlación, con un intervalo de confianza (Wei and Simko 2017).

## 5.2 EXPERIMENTOS EN CONTINUO

### 5.2.1 Sustrato

Los efluentes de la industria vitivinícola se obtuvieron de una Bodega ubicada en Ezequiel Montes, Querétaro, México. Se realizó la caracterización del efluente, tomando los siguientes parámetros: pH, AGV, demanda química de oxígeno total y soluble (DQOt y DQOs respectivamente), carbohidratos solubles y totales, SST y SSV. Los efluentes se centrifugaron (J-E Centrifuge, Avanti, PAIS) a 5000 rpm durante 15 minutos, con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de sólidos y evitar el taponamiento de los reactores.

### 5.2.2 Inóculo

El reactor granular se inoculó con gránulos obtenidos de un reactor UASB que trata aguas residuales de una cervecería en Guadalajara, Jalisco; los cuales se trataron térmicamente hirviéndolos durante 15 minutos con el objetivo de inhibir la actividad metanogénica sin dañar la estructura y morfología de los gránulos, tal como lo menciona la metodología de Yin et al., (2018). La concentración inicial del inóculo en el reactor UASB fue 10 g SV/L (Liu 2008).

Para la colonización de los empaques del reactor TBR, se utilizó la metodología empleada por Fernandes et al., (2013), en donde los microorganismos se obtuvieron mediante una fermentación natural de los efluentes vitivinícolas, sin la adición previa de algún inóculo. El sustrato fue almacenado durante 3 días en un vaso precipitado abierto a la intemperie, aproximadamente a 25 ° C y ajustado a un pH de 7. La fermentación del sustrato fue causada por los microorganismos presentes en la atmósfera y en los efluentes vitivinícolas. Posteriormente, se empezaron a colonizar los soportes recirculando los efluentes vitivinícolas (velocidad ascensional de 2 m/h) a través del reactor a una temperatura de 37°C durante tres días para asegurar la adhesión de la biomasa en los soportes.

### 5.2.3 Reactores de biomasa fija

En la Tabla 8, se especifican los criterios y dimensiones de los reactores. El TBR, adicionalmente contó con un tanque de recirculación, teniendo la función de almacenar cierto volumen de efluente para recircularlo a través de los empaques.

Tabla 8. Dimensiones de los reactores TBR y UASB

Criterio	Reactor TBR		Reactor UASB
	Tanque con lecho empacado (T1)	Tanque recirculador (T2)	
Material de construcción	Acrílico	Acrílico	Acrílico
Diámetro (cm)	9	9	9
Altura (cm)	36.5	15	36.5
Volumen de trabajo (L)	1.0	0.8	1.5
Volumen total (L)	2.0	1.0	2.0

En el TBR (Figura 5) el T1 contenía un volumen de trabajo de 1.7 L y un volumen de 1 L ocupado por empaques construidos de polietileno de alta densidad (HDPE) (2H, BCN 009 plus, Alemania), con una densidad de 0.92 g/cm<sup>3</sup> y una relación área/volumen (A/V) de 68.7 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup>; teniendo como función el soporte donde se adhirió la biomasa para la formación de una biopelícula (Guevara-López and Buitrón 2015).

En el T1 los flujos de alimentación y de recirculación ingresaron por la parte superior del T1, en donde ambos flujos se dispersan por todo el cilindro mediante un micro-aspersor (MS7PC9D, Toro, Estados Unidos) con una capacidad máxima de flujo de 38.6 L/h. Mientras el efluente tuvo salida por la parte inferior del T1. Por otro lado, el flujo de recirculación ingresó al T2 por acción de la gravedad. El contenido del T2 se homogenizó mediante un agitador magnético a 120 rpm. En la parte superior del T2 se ubicó la salida del flujo de recirculación y un electrodo de pH. La salida del flujo de biogás acumulado, tanto en el T1 como el T2, se situó en la parte superior de los reactores, conectada a una trampa de humedad y de H<sub>2</sub>S. El biogás se midió mediante un instrumento de medición de flujo (µflow, Bioprocess Control, Suecia). Para controlar la temperatura del T1, se colocó un criotermostato de circulación (RT4, Vivo Itherm, Alemania).

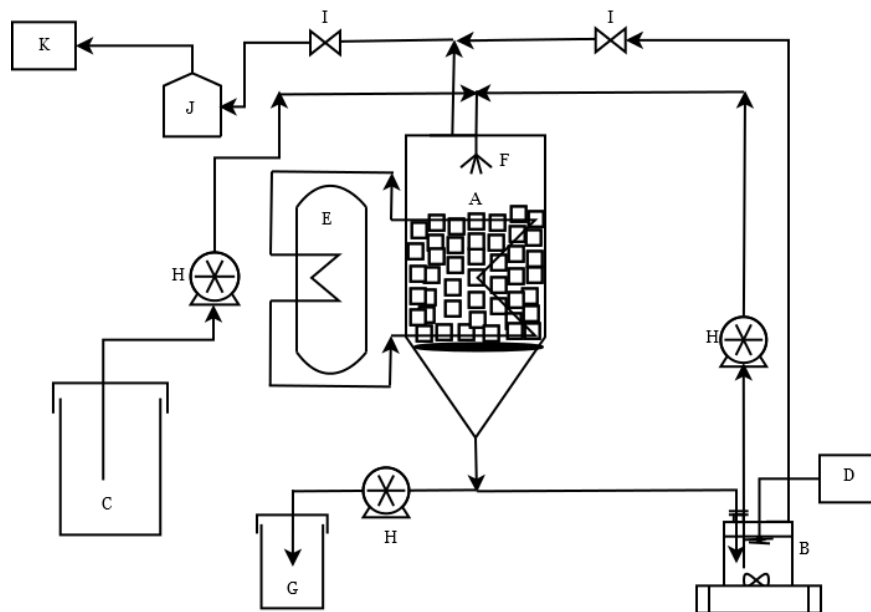


Figura 5. Diagrama del TBR. A) Tanque con lecho empacado (T1); B) Tanque de recirculación (T2); C) Tanque de almacenamiento del sustrato; D) Potenciómetro; E) Criotermostato de recirculación para control de temperatura; F) Dispositivo de aspersión del sustrato; G) Tanque de almacenamiento del efluente; H) Bomba peristálticas; I) Válvulas para muestreo de biogás; J) Trampa de humedad y H<sub>2</sub>S; K) Medidor de Flujo Volumétrico

En el reactor UASB (Figura 6) el flujo de alimentación y el de recirculación se introdujo por la parte inferior del reactor, mientras que el efluente, por acción de la gravedad, salió por la parte superior del reactor. Encima del reactor se colocó un electrodo de pH para su seguimiento. Tanto, el seguimiento del biogás como el control de temperatura fue similar al utilizado en el TBR.

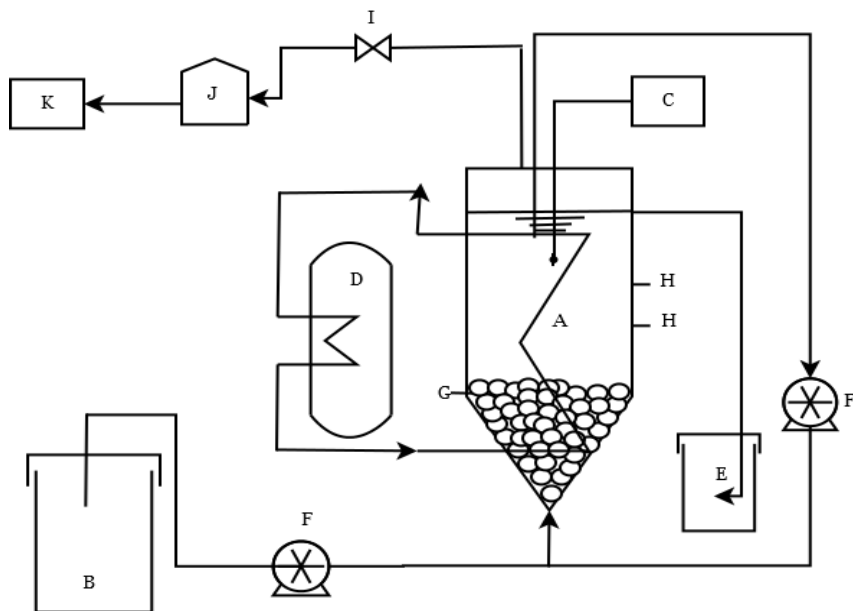


Figura 6. Diagrama del UASB. A) Tanque con biomasa fija; B) Tanque de almacenamiento del sustrato; C) Potenciómetro; D) Criotermostato de recirculación; E) Tanque de almacenamiento del efluente, F) Bomba peristálticas; G) Punto de muestreo de lodos; H) Punto de muestreo del reactor; I) Válvulas para muestreo de biogás; J) Trampa de humedad y H<sub>2</sub>S; K) Medidor de Flujo Volumétrico

#### 5.2.4 Operación de los reactores de biomasa fija

Ambos reactores fueron operados a un pH a 5.5 ajustado la alimentación con una solución de NaOH 10 N, una temperatura de 37 °C, un TRH de 5.5 h y una velocidad de recirculación de 2 m/h (Lin et al. 2012; Mohammadi et al. 2017). Se evaluaron distintas TCO variando la concentración de los efluentes vitivinícolas (Tabla 9). El cambio de TCO se realizó cuando se observó una VVPH estable durante 20 TRH (% Desviación estándar Relativa (DER) =  $\leq 20$ ) (Oh et al. 2004).

Durante la operación, se registró la producción acumulada de biogás tomando datos dos veces al día, mientras la composición de hidrógeno se midió tres veces por semana. Se tomaron muestras del efluente dos veces por semana para el seguimiento de DQO<sub>s</sub>, carbohidratos solubles, AGV's, SST y SSV. Mientras para los análisis moleculares de las comunidades microbianas se tomaron muestras de biomasa al final de cada TCO evaluada.

Tabla 9. Resumen de las diferentes TCO que se emplearon durante el experimento

Fase	% de efluentes vitivinícolas	TCO (g DQO/L-d)
I	20	202
II	33	337
III	50	505
IV	100	1011

#### 5.2.5 Microscopía Electrónica de Barrido

Se tomaron muestras de los soportes del TBR y gránulos del UASB al final de cada TCO para ser observados mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Antes de la observación, cada muestra fue preparada siguiendo el método modificado de Murtey and Ramasamy (2016). Cada muestra fue fijada con formaldehído al 3%, preparado con buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.2) durante 24 h. Se descartó el formaldehído para seguir con un lavado de buffer de fosfatos. Fueron

deshidratadas utilizando diferentes concentraciones de etanol, números de lavados y tiempo de lavado (Tabla 10). Al finalizar, fueron conservadas en etanol al 99% a una temperatura de 4°C hasta su observación por MEB. Un día antes de la observación, fueron secadas con hielo seco hasta alcanzar el punto crítico, y la superficie fue revestida con oro para el análisis de MEB (EVO-50, Carl Zeiss, Reino Unido).

Tabla 10. Concentraciones de etanol y tiempo de lavados

Concentración de etanol (% v/v)	Número de lavados	Tiempo de lavado (min)
20	2	15
30	2	15
50	1	30
70	1	30
95	1	30

### 5.2.6 Determinación de H<sub>2</sub> disuelto

Se realizó la determinación del H<sub>2</sub> disuelto en la Fase III (505 g DQO/L-d) en ambos reactores. Se tomaron muestras de 580 mL del efluente en botellas anaerobias (BELLCO, Bellco Glass, USA) de 610 mL de volumen total, por triplicado. Se agregó 1 mL de HCl al 38 % v/v por cada 100 mL de muestra para eliminar la actividad microbiana y contabilizar solamente el hidrógeno disuelto en el efluente. Cada vez que se llenaba la botella, se cerraban herméticamente. Se colocó teflón sobre la rosca para sellar y evitar el escape del hidrógeno. Se dejaron a temperatura ambiente durante 24 h para equilibrar la fase gaseosa de la líquida. Posteriormente se analizó la composición del espacio de cabeza. Para obtener la concentración de hidrógeno disuelto en el efluente, se utilizaron las siguientes ecuaciones (Ec 13 a 16) (Sander, 1999):

$$H=H^{\circ} e^{\left[ \frac{d \ln H}{dT} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T^{\circ}} \right) \right]} \quad \text{Ec.13}$$

Inicialmente se hizo una corrección de la constante de Henry del hidrógeno (H) ajustada a la temperatura del sistema (adimensional), donde H<sup>o</sup> es la constante de Henry del hidrógeno a una temperatura de 298.15°K (adimensional), T es la temperatura a la cual está operando el reactor (K) T° es la temperatura ambiente (K).

Después de equilibrar la fase gaseosa y líquida, se tomó una muestra del espacio de cabeza de la botella, para calcular la masa de hidrógeno que se encuentra en la fase gaseosa de la botella (g H<sub>2</sub>/L<sub>gas</sub>) aplicando la Ec. 14.

$$\frac{g \text{ H}_2}{L \text{ gas}} = \frac{\left( \frac{\% \text{H}_2}{100} \right) * PM}{RT} \quad \text{Ec. 14}$$

Donde % H<sub>2</sub> es el porcentaje de hidrógeno en la fase gaseosa, R es la constante de los gases ideales ajustada a la presión atmosférica del sitio (0.105 L/mol K), T es la temperatura del reactor (K) y PM es el peso molecular del hidrógeno (g/mol).

Los gramos de hidrógeno que se encuentra tanto en la fase líquida como la fase gaseosa de la botella se

calcularon con la Ec. 15.

$$\frac{g \text{ H}_2}{L_{\text{total}}} = \frac{\frac{g \text{ H}_2}{L \text{ gas}} \left( V_G + \frac{V_L}{H} \right)}{V_T} \quad \text{Ec. 15}$$

Donde  $g \text{ H}_2/L_{\text{total}}$  es la cantidad de hidrógeno en la fase gaseosa,  $V_G$  es el volumen del cabezal (L),  $V_L$  es el volumen del efluente (L) y  $V_T$  es el volumen total de trabajo (L).

La determinación del hidrógeno disuelto en el efluente del reactor se realizó a partir de la siguiente ecuación (Ec. 16).

$$\frac{g \text{ H}_2}{L_{\text{efluente}}} = \frac{g \text{ H}_2}{L_{\text{total}}} \left( \frac{V_T}{V_L} \right) \quad \text{Ec. 16}$$

### 5.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

La determinación de DQO (total y soluble) se realizó de acuerdo al método Hach 435, mientras que los carbohidratos (totales y solubles) se midieron tomando de referencia el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956). Los SST, SSV, ST y SVT se realizaron por métodos estándar (APHA, 2012). Para el análisis de sólidos en el TBR, se tomaron muestras de 40 empaques por triplicado, colocando cada muestra en tubos falcón de 50 mL. Para concentrar la biomasa, se agregó 25 mL de agua destilada, se agitó para desprender la biomasa de los empaques y se retiraron los empaques sin la biomasa deprendida. Se vació la biomasa concentrada en el agua a un crisol y se siguió el mismo procedimiento descrito por el método estándar mencionado anteriormente.

Para realizar el análisis del biogás, se tomó una muestra de 5 mL de las botellas o del biorreactor con ayuda de una jeringa, succionando y desplazando el biogás tres veces, para asegurar la homogeneidad. La composición del biogás se analizó usando un cromatógrafo de gases (8610C, SRI Instruments, Torrance, CA, USA) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) y dos columnas empacadas (ambas de 6 pies x 1/8 pulgada, una de silica gel y la otra de tamiz molecular 13x), el gas acarreador fue nitrógeno a una velocidad de 20 mL/min, las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron a 90 °C y 150 °C, respectivamente. La temperatura de la columna se mantuvo a 40 °C durante cuatro minutos y se incrementó hasta 110 °C a una velocidad de 20 °C/min, esta temperatura se mantuvo durante 1.5 minutos.

Las muestras para determinar la concentración de AGV's y solventes en el efluente de los reactores se acidificaron a un pH menor a dos con HCl, se centrifugaron por 10 minutos a 3500 rpm, se filtraron con filtros de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis antes de 48 h. Los AGVs y solventes se determinaron empleando un cromatógrafo de gases (7890 B, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado con un detector de ionización de flama (FID) y una columna Zebron ZB-FFAP de 15 m de longitud (530  $\mu\text{m}$  x 1  $\mu\text{m}$ ). El gas acarreador fue nitrógeno a una velocidad de 2.5 mL/min, las temperaturas del inyector y el detector se mantuvieron en 190 °C y 210 °C, respectivamente. La temperatura de la columna se mantuvo a 60 °C, incrementando hasta 90 °C a una velocidad de 15 °C/min, con un segundo incremento hasta 170 °C a una velocidad de 25 °C/min, esta temperatura se mantuvo durante cuatro minutos. Para el caso del ácido láctico, fue cuantificado en

un cromatógrafo de HPLC (1260, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado con un detector de matriz de diodos y de índice de refracción acoplado a una columna AMINEX HPX-87 H. Se utilizó una solución 5 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como eluyente (0.6 mL/min). La temperatura de la columna fue de 50°C.

#### **5.4 CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD MICROBIANA**

Para caracterizar la composición del consorcio bacteriano ante distintas concentraciones de etanol (sección 5.1), y conocer la dinámica bacteriana en ambos reactores en cada TCO evaluada, se retiró una muestra de biomasa y se conservó a -20 ° C hasta su análisis. El ADN genómico se extrajo de las muestras de biomasa utilizando el kit de aislamiento de ADN PowerSoil® (MOBIO, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración del ADN se cuantificó por espectrofotometría utilizando un NANODrop 2000c (Thermo Scientific, EE. UU.). El ADN se envió al Laboratorio de Investigación y Pruebas (RTL, Lubbock, EE. UU.) para la secuenciación de Illumina MiSeq, utilizando los cebadores para bacterias 28F (GAGTTTGATCNTGGCTCAG) y 388R (TGCTGCCTCCCGTAGGAGT) de 16s rADN gen (Barragán-Trinidad, et al., 2017).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ETANOL EN LA FERMENTACIÓN OSCURA UTILIZANDO SUSTRATO MODELO

#### 6.1.1 Efecto del etanol en la producción de hidrógeno y tiempo de latencia

Durante los experimentos en lote, la producción máxima de hidrógeno fue de 439 mL/L<sub>reactor</sub> en la condición sin etanol (0 g/L), observando una tendencia negativa conforme aumentaba la concentración de etanol; disminuyendo en un 48% el hidrógeno acumulado a una concentración de 33 g/L respecto a la condición de 0 g/L (Figura 7). Al realizar un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, se comprobó que las diferentes concentraciones de etanol evaluadas tuvieron un efecto significativo sobre la producción de hidrógeno acumulado. Al realizar la prueba de Tukey, se demostró que no existe una diferencia significativa en la disminución de hidrógeno entre los intervalos de concentraciones de 6 a 18 g/L y 24 a 33 g/L; estos diferentes rangos de inhibición a distintas concentraciones de etanol, se explica por la selección de la comunidad microbiana, como se discute en la sección 6.1.4.

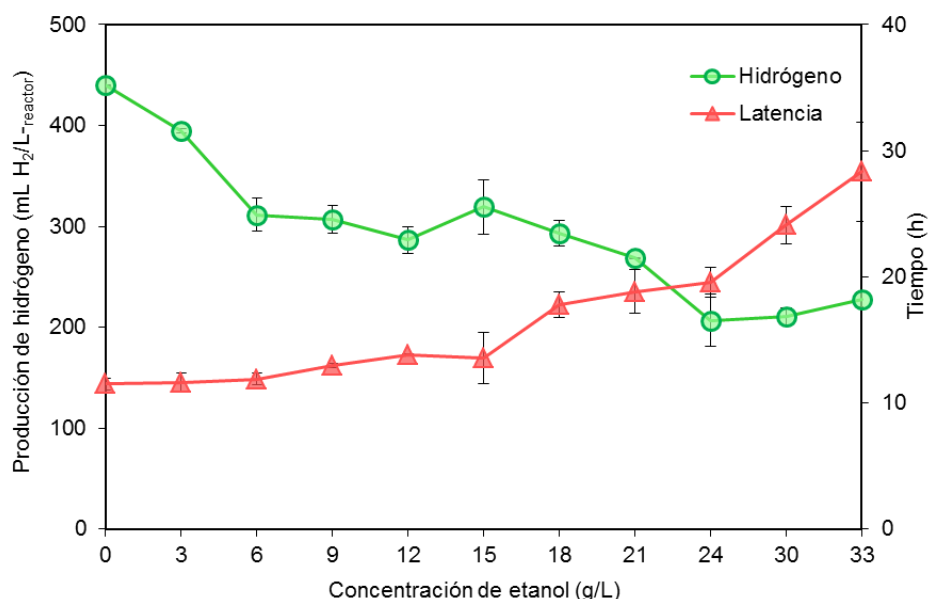


Figura 7. Producción de hidrógeno acumulado y tiempo de latencia a diferentes concentraciones de etanol.

La inhibición en la producción de hidrógeno por el etanol ha sido comprobada en otros trabajos. Wang et al., (2008) observaron una disminución del 57% cuando emplearon una concentración de 13.2 g/L respecto a la condición sin etanol añadido utilizando glucosa como fuente de carbono y un cultivo mixto. Tang et al., (2012) en un rango de 0-9.2 g/L, observaron que la producción de hidrógeno decreció en un 54% en la máxima concentración en comparación cuando no se añadió el compuesto inhibitorio en una cepa pura (*Ethanoligenens harbinense* B49). Mejía-Saucedo, (2018) probando diferentes concentraciones (0, 10.5, 12.6, 14.7, 17, 21, 40 y 105 g/L) pero empleando efluentes vitivinícolas como sustrato y un cultivo mixto, observaron que al utilizar una concentración de 21 g/L, la producción de hidrógeno disminuyó en un 69% con respecto a la producción máxima ( $\approx 1600$  mL H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>, 0 g/L); además de que cesó cuando emplearon concentraciones de 40 y 105 g/L. Al parecer



existe un efecto inhibitorio cuando se añade etanol en la tasa de producción de hidrógeno, independientemente si se utiliza un sustrato modelo o real, inclusive si es un inóculo mixto o puro.

Por otra parte, el tiempo de latencia se incrementó conforme fue aumentando la concentración de etanol. Aumentó 3.7 veces en la concentración más alta con respecto a la condición donde no se utilizó el compuesto inhibitorio. Al realizar una prueba de Tukey no se observó una diferencia significativa entre las condiciones de 0-15, 18-24 y 30-33 g/L, significando que los microorganismos a hasta una concentración de 15 g/L pueden empezar a producir hidrógeno en un mismo lapso de tiempo. La misma tendencia la reportó Mejía-Saucedo (2018), observando un incremento de 96 veces en el tiempo de latencia en la concentración de 21 g/L con respecto a la condición de 0 g/L. El mayor efecto inhibitorio utilizando efluentes vitivinícolas en comparación con el experimento realizado con glucosa, probablemente se debe a la presencia de otros compuestos inhibitorios diferentes al etanol en el efluente, tal como fenoles (Albarrán-Contreras 2017; Bundhoo and Mohee 2016; Mejía-Saucedo 2018).

### 6.1.2 Efecto del etanol en el crecimiento de biomasa y consumo de carbohidratos

El crecimiento de la biomasa entre las concentraciones de etanol de 0 g/L a 30 g/L fue significativamente igual (Figura 8). Este crecimiento de biomasa no reflejó un incremento en la producción de hidrógeno acumulado, debido a que los microorganismos optaron por rutas metabólicas no asociadas a la producción de hidrógeno al aumentar gradualmente la concentración de etanol (Figura 7).

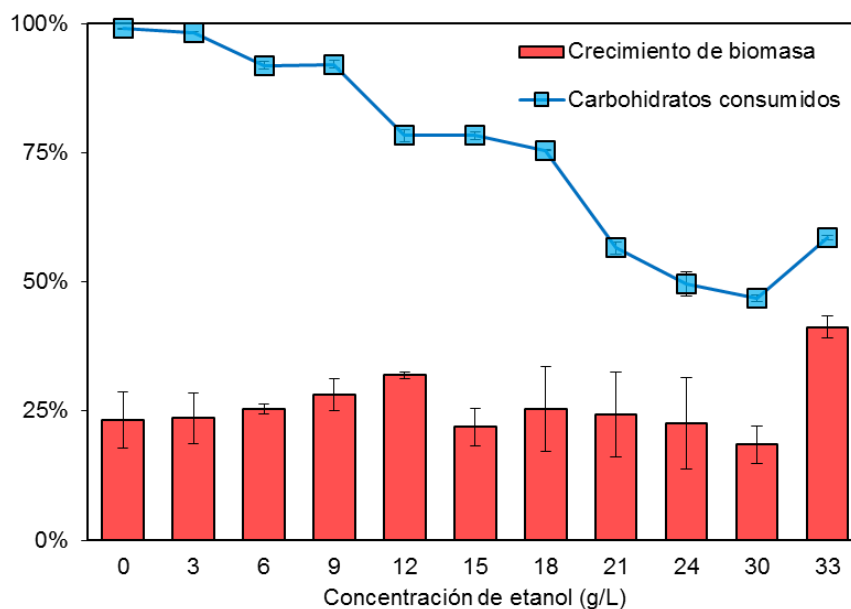


Figura 8. Crecimiento de biomasa medida como SSV y carbohidratos consumidos a diferentes concentraciones de etanol.

Este comportamiento es distinto al obtenido por Tang et al., (2012), debido a que el aumento en la concentración de etanol reflejó una reducción de biomasa en un 16.2 % a una concentración de 9.2 g/L con respecto cuando no se añadió el compuesto. No obstante el experimento emplearon *Ethanoligenens harbinense* B49 como inóculo, a diferencia del presente trabajo en donde se utilizó un cultivo mixto que

ocasiona una mayor diversidad de microorganismos presentes en el inóculo.

A la mayor concentración de etanol evaluada (33 g/L) se observó un incremento significativo de biomasa respecto a concentraciones menores. Este aumento se puede deber a la selección de microorganismos productores de ácidos grasos de cadena media, como se muestra con el aumento de ácido caproico a 33 g/L (Figura 9); y posiblemente a la producción de otros ácidos grasos no identificados, como el ácido caprílico ó el ácido heptanoico. Estos ácidos grasos de cadena media se producen a altas concentraciones de etanol añadiendo AGV de cadena corta (como el ácido acético) (Angenent et al. 2016). La selección de microorganismos a 33 g/L se corroboró en el análisis de la comunidad realizado (sección 6.1.4).

Mientras el consumo de glucosa (Figura 8) fue disminuyendo al aumentar la concentración de etanol, entre 92-99% y 45-78% respecto a concentraciones de etanol de 0-9 g/L y de 12-33 g/L, respectivamente. La disminución en la degradación de carbohidratos por aumento del etanol también se vio igualmente reflejado en el trabajo realizado por Tang et al., (2012), reportando una disminución del consumo de etanol del 98% al 68%, de 0 g/L a 9.2 g/L de etanol, respectivamente. Aun empleando la mayor concentración, hubo consumo de sustrato que se relaciona con el incremento de biomasa (Figura 8) y metabolitos (Figura 9).

### 6.1.3 Producción de metabolitos a diferentes concentraciones de etanol

Respecto a los rendimientos en la producción de AGV en DQO equivalente ( $DQO_{eq}$ ) en relación a la DQO consumida ( $DQO_c$ ) (Figura 9), la condición de 0 g/L, presentó en mayor proporción el ácido butírico con un rendimiento de 0.32 g  $DQO_{eq}$  /g  $DQO_c$ , mientras el ácido acético se obtuvo un rendimiento de 0.08 g  $DQO_{eq}$  /g  $DQO_{con}$ .

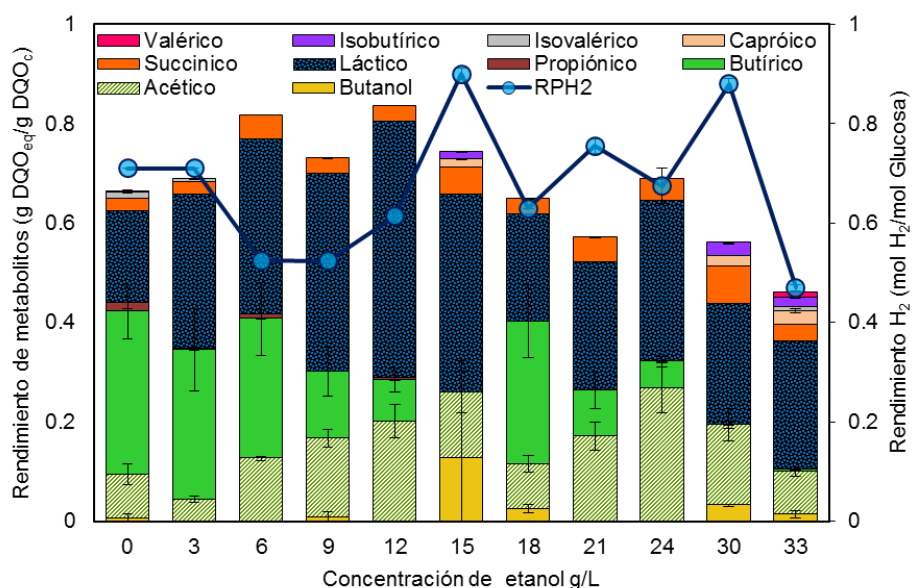


Figura 9. Rendimientos durante la fermentación oscura

Durante la fermentación oscura, cuando el ácido acético o ácido butírico son los únicos AGV producidos, se logran mayores rendimientos de producción de hidrógeno ( $RPH_2$ ) alcanzando 4 o 2 mol  $H_2$  por mol de glucosa, respectivamente. Sin embargo, observando los  $RPH_2$  experimentales con respecto al consumo de glucosa, no se logró el rendimiento máximo teórico reportado en la literatura (Liu 2008). Los bajos  $RPH_2$  lo podemos atribuir a la producción de metabolitos por vías bioquímicas, donde no favorece la producción de hidrógeno a partir de glucosa (Hallenbeck and Benemann 2002). Metabolitos como el ácido láctico, representa una baja en la producción de hidrógeno, debido a que se utiliza glucosa como fuente de carbono para su producción (Ghimire et al. 2015).

El ácido láctico se obtuvo a un mayor rendimiento cuando se utilizó un rango de concentración de etanol de 3-15 g/L, alcanzando rendimientos de 0.30 a 0.51 g  $DQO_{eq}/g$   $DQO_c$ . A partir de la concentración de 18 g/L hubo una disminución en el rendimiento del ácido láctico del 37-58% con respecto al máximo obtenido en la condición 12 g/L. El efecto del etanol sobre bacterias productoras de ácido láctico (BAL) ha sido estudiado con anterioridad en trabajos sobre la vinificación y conservación de vinos. Lafon Lafourcade et al. (1983) evaluaron tres concentraciones de etanol 78.9 g/L, 88.8 g/L, 99.75 g/L en el crecimiento de las BAL. Para las concentraciones de 78.9 g/L y 88.8 g/L, las poblaciones celulares de las BAL permanecieron inicialmente constantes alrededor de  $10^6$  a  $10^7$  células/mL pero gradualmente fue reduciéndose a  $10^4$  a  $10^5$  células/mL cuando pasaron 200 días. Para 99.75 g/L exhibió una progresiva reducción en viabilidad de BAL y no fueron detectables después de 117 días. Wibowo et al., (1985), menciona que las BAL disminuyen cuando la concentración de etanol aumenta por encima de 78.9 g/L. La concentración mínima de etanol mencionada en los trabajos de Lafon Lafourcade et al., (1983) y Wibowo et al., (1985) es casi 3 veces mayor con respecto a la máxima concentración evaluado en este trabajo. Sin embargo ambos trabajos utilizaron condiciones óptimas para el crecimiento de las BAL (temperatura de 20 a 25 °C y pH 3.4), justificando la tolerancia a concentraciones mayores de etanol que las evaluadas en este trabajo.

#### **6.1.4 Dinámica de la comunidad microbiana a distintas concentraciones de etanol**

En los resultados obtenidos de la caracterización de la comunidad bacteriana (Figura 10) se observó diferencias en la abundancia y composición de las especies entre las diferentes concentraciones de etanol. Realizando el análisis de distancia por agrupamiento, se observó que las concentraciones de 6 y 12 g/L se unen en un grupo con una distancia  $> 0.50$ . Su similitud se debe principalmente a la mayor abundancia relativa presentado por el género *Lactobacillus*. Esto se ve reflejado incluso en la producción de hidrógeno y en los metabolitos, debido a que en estas concentraciones de etanol disminuyó el hidrógeno acumulado en un 24-30% respecto a la productividad máxima (415.2 mL  $H_2/L_{reactor}$ ); mientras aumentó la concentración del ácido láctico entre el 177 y 222% en relación a 0 g/L. Además, se observa que *Lactobacillus* desplaza a *Enterobacter* (BPH), disminuyendo su abundancia relativa entre un 84 y 63% con respecto a la condición sin adición de etanol. En este sentido, se ha demostrado que *Lactobacillus* es capaz de lograr un efecto antagónico de amplio espectro, principalmente por competencia de sustrato, inhibición y estrategias de desplazamiento (Jiang et al. 2016). Sin embargo, en el siguiente grupo, concentraciones de etanol entre 18 y 24 g/L con una distancia de agrupamiento  $>0.1$ , se observó una disminución alrededor de un 99% en la abundancia relativa del género *Lactobacillus*, mientras que el género *Enterobacter* incrementó entre un 85-88%.

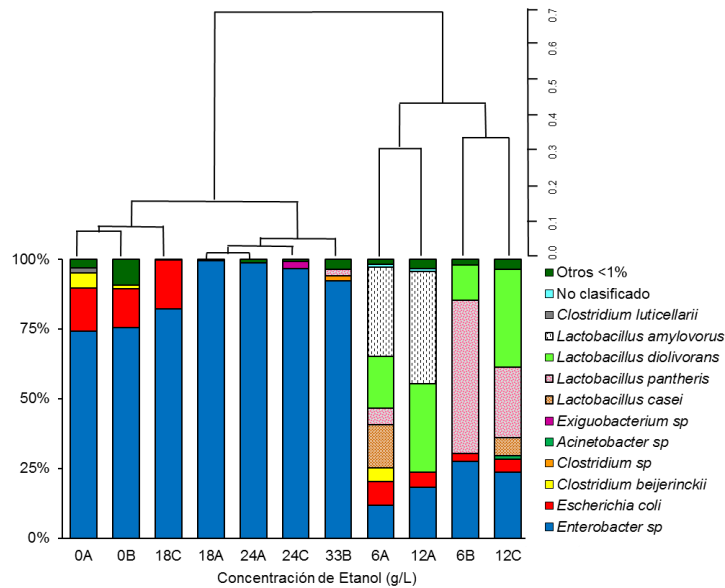


Figura 10. Abundancia relativa de bacterias y análisis de agrupamiento por distancias. A, B y C corresponden a las distintas replicas que fueron tomadas para cada condición

Nwachukwu et al., (2012) menciona que *Enterobacter aerogenes* es capaz de soportar concentraciones de etanol hasta 30 g/L debido a su capacidad adaptativa durante la fermentación anaerobia de glicerol a etanol. Estos resultados muestran que las distintas concentraciones de etanol afecta la selección de microorganismos y su abundancia relativa (Figura 10), afectando la producción y composición de metabolitos.

Del mismo modo, se realizó una matriz de correlación (Figura 11) entre distintas variables: la presencia de géneros de bacteria, metabolitos producidos y la producción de hidrógeno, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, que examina la magnitud y dirección de la relación lineal entre las variables. En este sentido, el valor del coeficiente de correlación puede variar de  $-1$  a  $+1$ , para correlaciones negativas o positivas, respectivamente. Mientras mayor sea el valor absoluto del coeficiente, más lineal será la relación entre las variables.

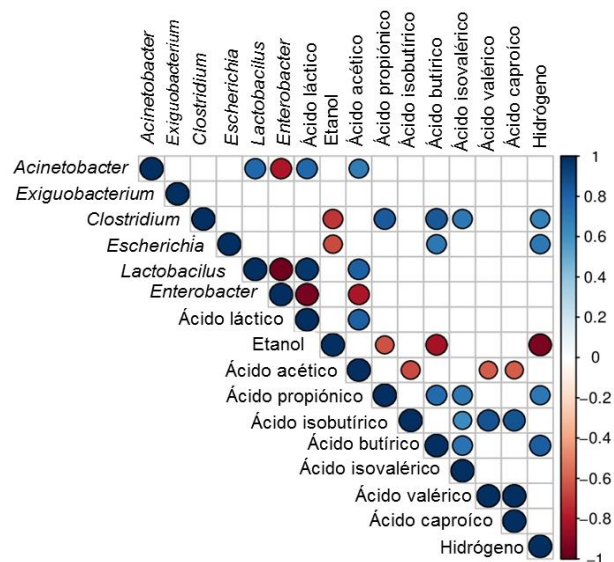


Figura 11. Matriz de correlaciones entre distintas variables. Los círculos muestran solo las correlaciones estadísticamente significantes ( $\alpha=0.05$ ).

El análisis estadístico muestra una correlación negativa significativa en la producción de hidrógeno con el aumento de la concentración de etanol, además de corroborar que el etanol afectó negativamente la abundancia de los géneros *Clostridium* y *Escherichia*, ambos reportados como productores de hidrógeno (Valdez-Vazquez and Poggi-Varaldo 2009). El ácido butírico, metabolito asociado a rendimientos teóricos altos para la producción de hidrógeno (Liu 2008), y el género *Clostridium* tuvieron una correlación positiva respecto a la producción de hidrógeno, suponiendo una fermentación ácido butírica.

### 6.1.5 Determinación de la constante de inhibición ( $K_c$ )

Con el objetivo de predecir cómo afecta la concentración de etanol la actividad hidrogenogénica específica durante la fermentación oscura, los datos experimentales del experimento en lote se ajustaron al modelo modificado de inhibición no competitiva de Han-Levenspiel, lo que resultó en valores de  $K_c = 28.9$  g/L y una constante de ajuste de  $n=2.7$  (Figura 12). Trabajos anteriores han empleado el modelo modificado de Han-Levenspiel para describir el efecto inhibitorio del etanol en la producción de hidrógeno, por ejemplo utilizando un cultivo puro se han reportado valores  $K_c$  de 6.4 g/L y 3.8 g/L, utilizando como inóculo *Ethanoligenens harbinense* B49 y *Caloramator celer*, respectivamente (Tang et al., 2012; Ciranna et al., 2014). El valor de  $K_c$  obtenido en este trabajo fue 4.5 y 7.6 veces superior al obtenido por Tang et al., (2012) y Ciranna et al., (2014) respectivamente, demostrando que la actividad hidrogenogénica específica en los cultivos mixtos es capaz de soportar una mayor concentración de etanol respecto a los cultivos puros reportados en la literatura.

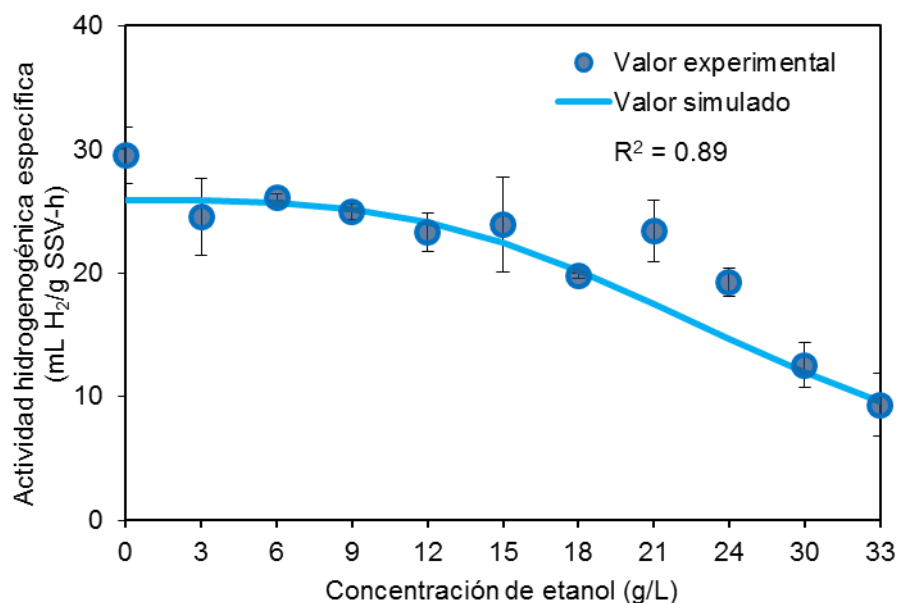


Figura 12. Actividad hidrogenogénica específica experimental y simulado por el modelo modificado de Han-Levenspiel.

## 6.2 EFECTO DE LA CARGA ORGÁNICA EN LA PRODUCCIÓN CONTINUA DE HIDRÓGENO EN SISTEMAS DE BIOMASA FIJA

### 6.2.1 Caracterización de los efluentes de la industria vitivinícola

Se realizó la caracterización del residuo para conocer las propiedades y su potencial para emplearlo como sustrato en la producción de hidrógeno, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 11.

Tabla 11. Caracterización de los efluentes de la industria vitivinícola utilizados en el proceso

Parámetros	Unidades	Valor
pH	-	2.5
SST	g/L	37
SSV	g/L	31
Carbohidratos totales	g/L	5.1
Carbohidratos solubles	g/L	4.5
DQOt	g/L	250
DQOs	g/L	231
Etanol	g/L	105
Acético	mg/L	2120
Propiónico	mg/L	2090
Butírico	mg/L	280
Láctico	mg/L	5647
Succínico	mg/L	1451

La concentración de etanol se encuentra casi 4 veces por encima a la  $K_c$  obtenida (28.9 g/L) en un sistema en lote, esto podría significar que el etanol es el factor limitante en la producción de hidrógeno por fermentación oscura, debido a que pudiera ocasionar una inhibición en el proceso y por ende, una baja producción de hidrógeno. A pesar de ello, se ha demostrado que utilizando un sistema continuo de

biomasa fija se puede producir hidrógeno aun estando por encima de esa concentración, soportando hasta 52.5 g de etanol/L (Mejía-Saucedo 2018).

### 6.2.2 Colonización de soportes del TBR

Durante el arranque del TBR, se colonizaron los soportes en donde se observó biomasa adherida después de los tres días de operación en lote (Figura 13). Se realizó la caracterización de ST y SV, obteniendo  $16 \pm 0.4$  mg  $ST_{fijos}/\text{empaque}$  y  $15 \pm 0.5$  mg  $SV_{fijos}/\text{empaque}$ , con una concentración total de  $16.2$  g  $SV_{fijos}/L_{\text{reactor}}$ . Existen trabajos en donde emplearon empaques de polietileno para la producción de hidrógeno. La biomasa adherida a los soportes fue de  $124.6 \pm 0.02$  mg  $SV_{fijos}/\text{empaque}$ , el cual es 7.7 veces mayor a la adherida en el presente trabajo. Sin embargo, la concentración fue alcanzada hasta el final de la operación (Ferraz Júnior et al., 2015).

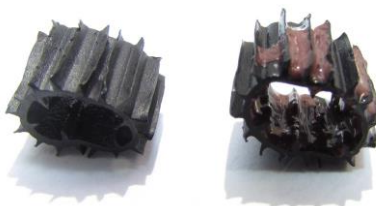


Figura 13. Empaques sin colonizar (lado izquierdo) y colonizado (lado derecho).

### 6.2.3 Producción continua de hidrógeno en sistemas de biomasa fija

Los reactores TBR y UASB (Figura 14) se operaron durante 86 y 123 días, teniendo máximas VVPH estables de  $142 \pm 12$  y  $78 \pm 6$  mL  $H_2/L_{\text{reactor}}\cdot h$  respectivamente, ambos a una TCO de 505 g DQO/L-d (Figura 15).

El aumento en la VVPH del TBR respecto al UASB, es debido a la mejor transferencia del biogás en la configuración del TBR, como se discute en la sección 6.2.7. Ambos reactores, cuando se utilizaron efluentes vitivinícolas sin dilución (TCO = 1010 g DQO/L-d), se observó un decaimiento gradual en la VVPH hasta llegar a ser nula dentro de 25 días de operación. Pudo ser considerado que al incrementar la TCO favorecería el aumento de la VVPH de forma secuencial en función de la cantidad de sustrato alimentado al reactor. Sin embargo, los efluentes vitivinícolas contienen compuestos que al aumentar la concentración del sustrato, incrementan su concentración hasta ser inhibitoria. Compuestos como el etanol (105 g/L), ha sido demostrado como un inhibidor en la producción de hidrógeno en sistemas en lote (Ciranna et al. 2014; Tang et al. 2012; Wang et al. 2008), discutido en la sección 6.1.

En la Tabla 12, se muestran las VVPH promedio estables y los rendimientos en función de la DQO alimentada ( $DQO_a$ ) para ambos reactores en las diferentes fases de operación. Tanto en el TBR y el UASB, se lograron VVPH promedio estables ( $DER \leq 20\%$ ) dentro de la Fases I-III. Cuando se obtuvieron las máximas VVPH estables, también se alcanzaron los mejores rendimientos con respecto a la  $DQO_a$ , alcanzando rendimientos de  $7 \pm 1$  y  $4 \pm 0.3$  mL  $H_2/g$   $DQO_a$  en el TBR y UASB respectivamente.



Figura 14. Reactores de biomasa fija, izquierda TBR y derecha reactor UASB.

En comparación con otros estudios (Tabla 13) que han utilizado los efluentes vitivinícolas como sustrato para la producción de hidrógeno, el TBR y el UASB incrementaron la VVPH 2.5 y 1.4 veces respectivamente, respecto a la mejor productividad reportada anteriormente (Mejía-Saucedo, 2018). Respecto a otros efluentes similares provenientes de la fermentación alcohólica, como lo son las vinazas tequileras y de caña de azúcar, la VVPH en el TBR fue 2 veces mayor en comparación a la máxima previamente reportada (Buitrón et al., 2014), mientras que la producción del UASB fue similar. Las TCO evaluadas con vinazas tequileras y caña de azúcar se encuentran entre 51 y 80 g DQO/L-d, mientras que la máxima VVPH que se obtuvo en este trabajo fue a una TCO de 505 g DQO/L-d. Esta mayor TCO utilizando efluentes vitivinícolas, se debe al alto contenido de etanol en los mismos, que representa el 87% de la DQO<sub>i</sub>.

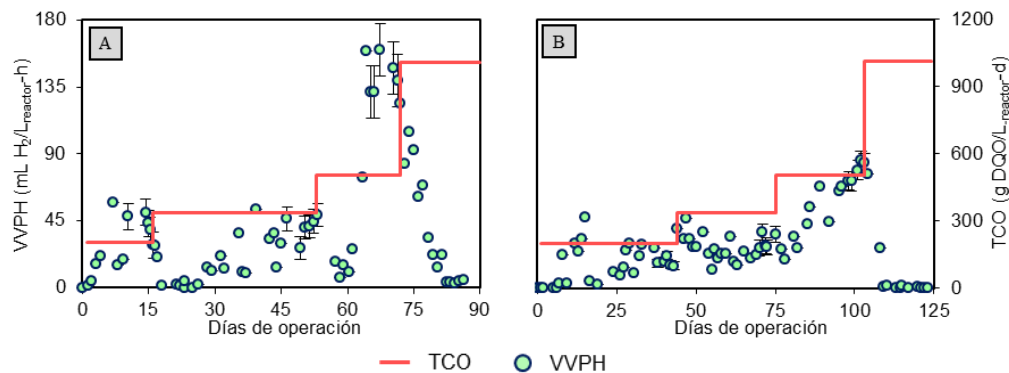


Figura 15. Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) en ambos reactores de biomasa fija, (A) TBR y (B) UASB, a distintas tasas de carga orgánica (TCO).

Debido a la alta carga orgánica presente en los efluentes vitivinícolas, se produjo un máximo rendimiento de  $778 \pm 66$  mL H<sub>2</sub>/L<sub>sustrato</sub> (TBR a 505 g DQO/L-d), el cual es 1.5 mayor a la reportada con vinazas de caña de azúcar, 516 mL H<sub>2</sub>/L<sub>sustrato</sub> 72 g DQO/L-d ( Ferraz Júnior et al. 2014).



Tabla 12. VVPH estables en el TBR y UASB a diferentes TCO

Reactor	Fase	TCO (g DQO/L-d)	VVPH estable (mL H <sub>2</sub> /L <sub>reactor</sub> -h)	Rendimiento de producción de H <sub>2</sub> (mL H <sub>2</sub> /g DQO <sub>a</sub> )
TBR	I	202	42 ± 9	5 ± 1
	II	337	44 ± 4	3 ± 1
	III	505	142 ± 12	7 ± 1
	IV	1011	4 ± 1	0.1 ± 0.01
UASB	I	202	17 ± 3	2 ± 0.3
	II	337	31 ± 5	2 ± 0.4
	III	505	78 ± 6	4 ± 0.3
	IV	1011	0.2 ± 0.4	0.01 ± 0.01

Tabla 13. Trabajos que han producido hidrógeno con efluentes vitivinícolas y sustratos similares

Reactor <sup>a</sup>	Sustrato	Carga orgánica (g DQO/L <sub>reactor</sub> -d)	Máxima VVPH (mL H <sub>2</sub> /L <sub>reactor</sub> - h)	Máximo rendimiento de producción de H <sub>2</sub> (mL H <sub>2</sub> /g DQO <sub>a</sub> )	Máximo rendimiento de producción de H <sub>2</sub> (mL H <sub>2</sub> /L <sub>sustrato</sub> )	Referencia
APBR	Vinazas tequileras	51	72±9	34±6	288±51	(Buitrón et al., 2014)
APBR	Vinazas de la caña de azúcar	72	43	16	516	(Ferraz Júnior et al., 2014)
UASB	Vinazas de la caña de azúcar	80	13	4±0.2	80±4	(González and Durán 2014)
UASB	Efluente vitivinícolas del vino blanco	218	44±2	5±1	250±20	(Albarrán- Contreras 2017)
APBR	Efluente vitivinícolas del vino tinto	523	56±19	2.5±1	312±112	(Mejía- Saucedo 2018)
TBR	Efluente vitivinícolas de vino tinto	505	142±12	7±1	778±66	En este trabajo
UASB	Efluente vitivinícolas de vino tinto	505	78±6	4±1	430±35	En este trabajo

APBR - Anaerobic Packed Bed Reactor

TBR – Trickle Bed Reactor

UASB – Upflow Anaerobic Sludge Blanket

VVPH – Velocidad Volumétrica de Producción de Hidrógeno

En el presente trabajo es interesante destacar que durante la Fase III en donde ambos reactores alcanzaron la máxima VVPH estable, hubo consumo del 98±2 % de ácido láctico en el TBR, con una producción mayoritaria de ácido butírico (4 g/L), acético (1.7 g/L) y propiónico (1 g/L). En tanto en el UASB se logró un consumo del 65±14 % de ácido láctico, con una producción mayoritaria de ácido butírico (2.2 g/L) y acético (0.23 g/L). Existen trabajos que implican el consumo de ácido láctico en relación a la producción de hidrógeno. Por ejemplo, Mejía-Saucedo (2018) experimentando una mezcla de ácido láctico (1g/L) y etanol (18 g/L) como sustrato para la producción de hidrógeno, obtuvo un

máximo rendimiento de 0.015 mL H<sub>2</sub>/g DQO<sub>eq</sub>; determinando que el ácido acético (0.3 g/L), propiónico (0.5 g/L) y butírico 0.2 g/L, fueron los metabolitos mayormente producidos al final del experimento. Mientras, Grause et al., (2012) utilizando un sustrato compuesto principalmente de lactato (22.4 g/L) y acetato de sodio (1.6 g/L), coincidieron la formación de hidrógeno y la disminución del ácido láctico y ácido acético, produciéndose ácido butírico (10.4 g/L) como principal metabolito. García-Depraect and León-Becerril (2018), estudiaron la producción de hidrógeno a partir de la ruta lactato-acetato, evaluaron diferentes concentraciones de vinazas tequileras (entre 5.7-57.7 g DQO/L) como sustrato real (en comparación a los trabajos descritos anteriormente en donde emplearon sustratos formulados); con concentraciones de ácido láctico y ácido acético en un rango de  $\approx$  8.5-0.8 y 6.4-0.6 respectivamente. Cuando emplearon la máxima concentración de vinazas tequileras obtuvieron la mayor PHA, observando al final de la cinética una disminución en la concentración de ácido láctico y ácido acético en un  $\approx$  90 y 60% respectivamente; produciendo principalmente ácido butírico ( $\approx$  6.2 g/L). Al parecer existen antecedentes que la presencia de ácido láctico y ácido acético en la fermentación oscura favorece la producción de hidrógeno, sintetizando ácido butírico como metabolito principal.

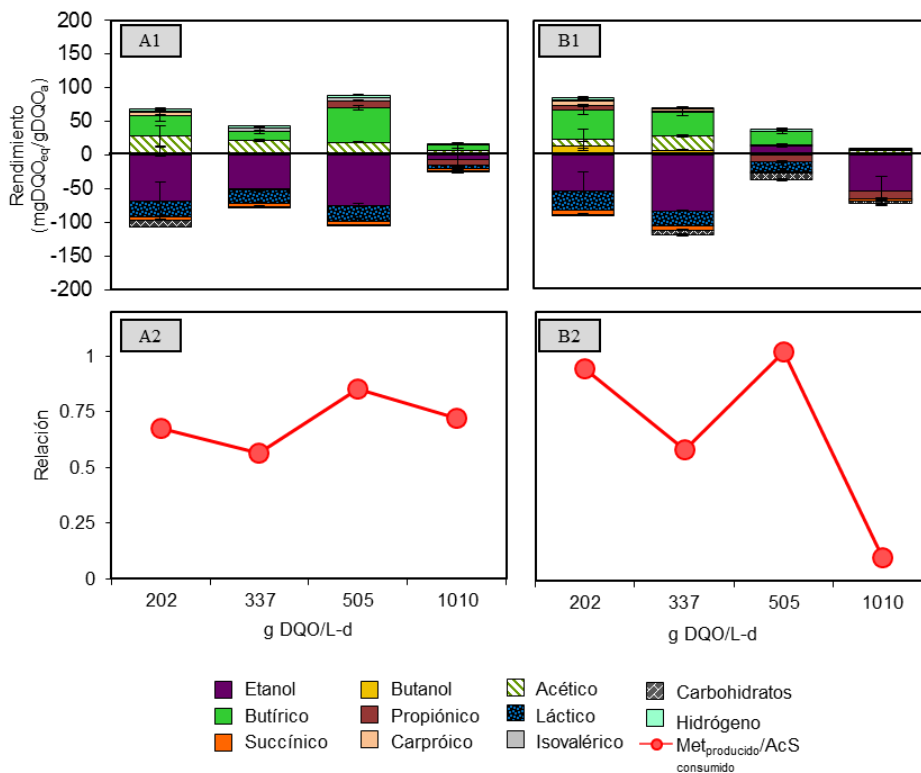


Figura 16. Valores promedio de producción de metabolitos (valores positivos) y consumo de ácidos y solventes presentes en los efluentes (valores negativos) en el TBR (A1) y en el UASB (B1), a las diferentes tasas de carga orgánica (TCO) evaluadas; y relación de metabolitos producidos y ácidos-solventes consumidos en el TBR (A2) y el UASB (B2), en DQO equivalente.

Considerando que existen distintas rutas metabólicas que pueden llevar a cabo los diferentes microorganismos, se calculó la relación de los metabolitos producidos ( $Met_{\text{producidos}}$ ) entre los ácidos-solventes consumidos ( $AcS_{\text{consumidos}}$ ) en términos de DQO equivalente (Figura 16, A2 y B2). En este sentido, operando a una TCO de 505 g DQO/L-d se logró una mayor relación  $Met_{\text{producidos}}/AcS_{\text{consumidos}}$

de  $0.95 \pm 0.1$  y  $0.7 \pm 0.1$  y en el TRB y UASB respectivamente. Debido a la complejidad de las comunidades microbianas en los sistemas fermentativos productores de  $H_2$ , es difícil discernir que otros metabolitos pudieron haber sido producidos; sin embargo, típicamente en los sistemas de biomasa fija de 8.5 a 19.7% de DQO se invierte en crecimiento de biomasa (Buitrón et al., 2014; Ferraz Júnior et al., 2015), y se ha sugerido que hasta 3.3 a 7% se puede invertir en formación de sustancias poliméricas extracelulares, indispensables para sistemas de biopelícula (Aquino and Stuckey 2008).

### 6.2.5 Dinámica de la comunidad microbiana ante diferentes TCO

Con el fin de evaluar los cambios en la comunidad bacteriana influidos por las distintas TCO operadas, se determinó la abundancia relativa de los géneros presentes y un análisis de agrupamiento por distancias (Figura 17).

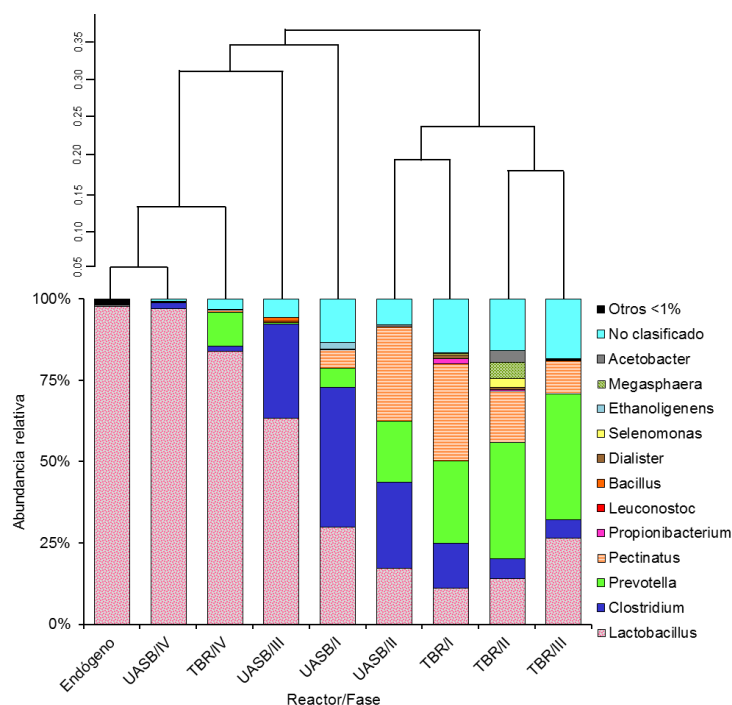


Figura 17. Abundancia relativa de bacterias y análisis de agrupamiento por distancias al final de cada fase de operación (I,II,III, IV). (A) TBR; (B) UASB.

En ambos reactores, los géneros *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Clostridium* y *Pectinatus* se presentaron en mayor abundancia relativa en las TCO evaluadas. Cuando se lograron las máximas VVPH estables (TCO = 505 g DQO/L-d), el género *Lactobacillus* se presentó en mayor abundancia relativa en el UASB, seguido de *Clostridium*; en tanto en el TBR, el género *Prevotella* presentó una mayor abundancia relativa, seguido de *Lactobacillus*, *Pectinatus* y *Clostridium*. Mientras, el análisis de agrupamiento por distancias, se observaron dos grandes grupos con una distancia  $>0.25$ . El primer grupo se compone del TRB en la Fase I, II y III y del UASB en la Fase II. Entretanto, el segundo grupo se constituyó al operar a la máxima TCO en ambos reactores; la comunidad bacteriana cambió hasta alcanzar una similitud cercana a la biomasa endógena de los efluentes vitivinícolas, la cual está conformado principalmente por *Lactobacillus*, género de bacterias ácido lácticas implicadas en la fermentación maloláctica durante el proceso de fabricación del vino (Lafon Lafourcade et al. 1983).

Diversos trabajos señalan que la microbiota puede cambiar únicamente variando la TCO en un proceso en continuo. Saraphirom & Reungsang (2010) variando cuatro TCO en un rango de 25 a 40 g DQO/L-d en un SBR empleando glucosa como fuente de carbono, observaron cambios en la comunidad bacteriana; mencionan que en cada TCO evaluada estuvieron presentes *Clostridium sp.* y *Lactococcus lactis*, además cuando alcanzaron el mayor rendimiento y VVPH (TCO de 30 DQO/L-d), *Lactobacillus sp.* estuvo presente. Yun & Cho (2016) evaluaron el efecto de diferentes TCO (19 a 35 g DQO/L-d) en la comunidad microbiana utilizando aguas residuales de melazas como sustrato; demostraron que hasta una TCO de 31 g DQO/L-d hubo mayor abundancia relativa de *Clostridiales* (54 – 62%), seguido de *Lactobacillales* (23 – 37%). Sin embargo, cuando incrementaron la TCO a 35 g DQO/L-d, *Lactobacillales* fue dominante (49%) seguido de *Clostridiales* (41%).

Con el fin de identificar el perfil de la microbiana implicada en las mayores VVPH y rendimientos alcanzados, se analizó la comunidad microbiana de la Fase III del TBR y UASB (Figura 19). Se observaron distintas abundancias relativas y grupos de bacterias, indicando una menor similitud de la comunidad bacteriana a pesar de operar a una misma TCO. Aun cuando se presume que la presencia del género *Lactobacillus* disminuye la producción de hidrógeno debido a que implica una competencia por el sustrato y liberación de bacteriocinas, ocasionando una inhibición en el crecimiento de las BPH (Bundhoo and Mohee 2016), en ambos reactores se observó un incremento en la abundancia relativa conforme fue aumentando la TCO, mejorando la productividad de hidrógeno y el rendimiento; a excepción de cuando se utilizaron efluentes vitivinícolas crudas. Autores han mencionado que las bacterias ácido lácticas son a menudo detectadas en consorcios mesófilos productores de hidrógeno y no necesariamente ocasionan efectos negativos en la productividad (Sikora et al. 2013). Yang et al., (2007) identificaron los distintos tipos de bacterias cuando los niveles de producción fueron altos y bajos, esto con el objetivo de conocer que bacterias están implicadas en la producción de hidrógeno. Mencionan que cuando hubo una alta producción de hidrógeno, *Lactobacillus* logró una abundancia relativa de 61.7%, mientras a una baja producción se obtuvieron solamente el 20.5%. Chojnacka et al., (2011) realizaron un análisis comparativo de bacterias productores de hidrógeno entre un lodo granular y una biopelícula adherida a rocas graníticas, mencionan que *Clostridiaceae* y bacterias heterolácticas fermentativas principalmente *Leuconostocaceae*, fueron dominantes en la biopelícula, mientras en el lodo granular dominaban primordialmente *Leuconstoc*, (bacterias heterolácticas fermentativas) *Streptococcaceae* y *Enterobacteriaceae*. Sin embargo, no es posible atribuir que el incremento de la abundancia relativa del género *Lactobacillus* aumentará la producción de hidrógeno, no obstante se presume que juega un papel importante, bajo ciertas condiciones, en la regulación del pH, hidrólisis de sustrato, retención de biomasa, consumo de oxígeno, desintoxicación del sustrato e incluso producción de hidrógeno (García-Depraect et al. 2019).

Por otro lado, cuando se obtuvieron las máximas VVPH en el TBR, el género *Prevotella* presentó una mayor abundancia relativa. Este género de bacteria tiene la habilidad de crecer en una gran variedad de carbohidratos, consumiendo celulosa para sintetizar ácido acético, propiónico y succínico, producir hidrógeno a partir de aminoácidos y tiene una función importante en la formación de la biopelícula (Goud et al., 2012). Reportado en sistemas productores de hidrógeno por fermentación oscura, por ejemplo, Dos Reis et al., (2015), analizaron la comunidad bacteriana de un reactor anaerobio de lecho fluidizado alimentado con vinazas de la caña de azúcar, obtuvieron que *Prevotella sp.* fue dominante con un 55%, seguido de *Megasphaera sp.* con 28%. Por otro lado, Goud et al., (2012), observaron que

los géneros *Prevotella*, *Clostridium* y *Bacteroidia* fueron dominantes en un reactor SBR alimentado con extracto de residuos vegetales.

Los siguientes géneros más abundantes en el reactor TBR fueron *Lactobacillus*, *Clostridium* y *Pectinatus*. Este última bacteria ha sido reportada como productor de hidrógeno a partir de ácido láctico para producir ácido acético y ácido propiónico como metabolitos principales (Ohnishi et al. 2012). Ferraz Júnior et al., (2015), que operaron un reactor APBR empleando vinazas de caña de azúcar como sustrato, analizaron la selección de la comunidad de diferentes poblaciones microbianas en la producción de hidrógeno, demostrando que cuando se logró una mayor producción de hidrógeno, se obtuvo en mayor abundancia *Pectinatus* con 54.1% y *Clostridium* 12.8%. En caso de *Prevotella* y *Lactobacillus* solamente lograron el 0.2 y 1.9% respectivamente.

### 6.2.6 Morfología bacteriana en los agregados

A las diferentes abundancias relativas en cada TCO, la morfología de los microorganismos en los empaques fue similar entre cada uno de los soportes. La biopelícula sobre los empaques estaba conformado principalmente por aglomerados de bacilos y espiroquetas (Figura 18), relacionado a una mayor abundancia relativa de bacterias con morfología bacilar como *Prevotella*, *Clostridium* y *Lactobacillus*, mientras la morfología de espiroqueta puede estar relacionada con la presencia de *Pectinatus* (Anon 2015).

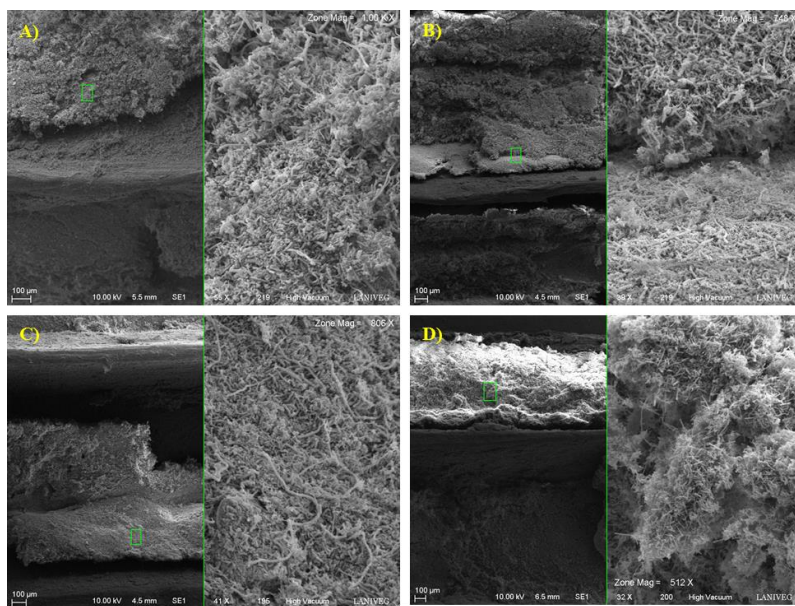


Figura 18. Micrografía de la superficie de los empaques al final de cada fase. A) Fase I (512 x magnificación); B) Fase II (806 x magnificación); C) Fase III (748 x magnificación); D) Fase IV (1000 x magnificación)

La micrografía de los gránulos (Figura 19), fue tomada únicamente al final de la Fase III, en donde se logró la máxima VVPH estable. Se observa una gran variedad de microorganismos conformado principalmente de bacilos tal como la morfología de *Clostridium* y *Lactobacillus* que (Anon 2015).

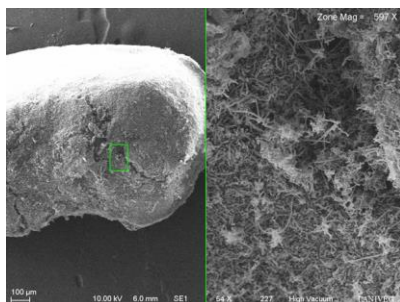


Figura 19. Micrografía de gránulo anaeróbico de la Fase III (597 x magnificación).

La formación de la biopelícula y gránulos se debe principalmente a la secreción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS por sus siglas en inglés “Extracellular polymeric substance”), por parte de microorganismos que actúan como barrera protectora difusiva (Chojnacka et al., 2011). Tanto el género *Lactobacillus* como *Prevotella* son bacterias que han sido reportadas como productoras de EPS formadoras de matrices microbianas (Gueimonde et al., 2006; Yamanaka et al., 2011).

### 6.2.7 Efecto de la configuración del reactor en la concentración de hidrógeno disuelto

En relación a la VVPH, el TBR logró mejores resultados en comparación a los trabajos descritos y al UASB utilizado en este trabajo, lo que se explica por la mejor transferencia de biogás desde la biopelícula a la fase gaseosa en el TBR. La ventaja de tener una mejor transferencia en el TBR se debe a la formación de una delgada capa de líquido que facilita la liberación del biogás en la biopelícula (Arreola-Vargas et al., 2015; Van Groenestijn et al., 2009). En este sentido, una mayor transferencia de hidrógeno ayuda a evitar limitaciones de la fermentación oscura relacionadas con la concentración de hidrógeno en el medio. Por ejemplo, altas concentraciones de hidrógeno disuelto puede inhibir a las enzimas hidrogenasas (encargadas de la catálisis en la producción de hidrógeno) (Sinha and Pandey 2011), o puede ocasionar un cambio en la ruta metabólica de las BPH (principalmente por el género *Clostridium*) hacia la homoacetogénesis (Saady 2013).

La determinación de hidrógeno disuelto en el efluente del TBR y UASB en la Fase III muestra una diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ) en ambos reactores (Tabla 14). En el TBR el valor teórico de hidrógeno disuelto dentro del reactor es semejante al obtenido en el efluente, lo que indica que la concentración se mantuvo constante. Sin embargo, en el UASB la concentración de hidrógeno en el efluente fue casi cero, posiblemente por un consumo de hidrógeno atribuido al género *Clostridium*, debido a que durante la Fase III se presentó una abundancia relativa del 26%, mientras que en el TBR únicamente del 5%. Existen especies de *Clostridium* como *C. acetium*, *C. thermoaceticum*, *C. acetobutylicum*, *C. ljungdahlii* y *C. stercorarium* que han sido reportadas como bacterias homoacetogénicas, utilizando  $H_2$  y  $CO_2$  como donador y aceptor de electrones respectivamente, donde el  $CO_2$  se reduce para formar ácido acético (Cabrol et al. 2017; Diekert and Wohlfarth 1994). La actividad homoacetogénica de estas especies se debe a que presentan la metaloenzima Fe-hidrogenasa (Fe- $H_2$ asa), que tiene la capacidad de la conversión reversible de  $H_2$  a  $H^+$  que dependerá del estado redox de la célula (Cabrol et al. 2017; Das et al. 2006)

Tabla 14. Concentración de hidrógeno disuelto en el efluente

Tipo de reactor	Teórico mg H <sub>2</sub> /L <sub>líquido</sub>	Efluente mg H <sub>2</sub> /L <sub>efluente</sub>
TBR	0.43	0.54±0.10
UASB	0.29	0.02±0.03

## 7. CONCLUSIONES

- El etanol tiene un efecto inhibitorio en la producción de hidrógeno, el cual se ajusta al modelo modificado de inhibición de Han-Levenspiel con una constante de inhibición de 28.86 g etanol/L. Esta inhibición se explica por un efecto en la comunidad microbiana, afectando significativamente la abundancia del género *Clostridium*, y otras variables como el tiempo de latencia y el consumo de carbohidratos.
- La producción de hidrógeno empleando efluentes vitivinícolas en los sistemas de biomasa fija en continuo fue estable en las tasas de carga orgánicas evaluadas hasta 505 g DQO/L-d. A tasas mayores, alimentando los efluentes vitivinícolas crudos, la productividad decayó hasta ser nula. Se logró una máxima VVPH de 142 y 78 mL/L<sub>reactor</sub>-h a una TCO = 505 g DQO/L-d tanto en el reactor TBR como en el UASB respectivamente.
- El TBR presentó una mayor producción de hidrógeno en comparación al UASB, debido a que en este último la concentración de hidrógeno disuelto en el efluente fue mucho menor al teórico, lo que indica un posible consumo de hidrógeno atribuido al género *Clostridium*.
- Se observó una mayor selección en la comunidad bacteriana productora de hidrógeno al aumento de la TCO, conformado principalmente por *Prevotella* y *Clostridium*, no así al operar con efluentes vitivinícolas sin dilución, donde *Lactobacillus* fue predominante.



## BIBLIOGRAFÍA

- Albarrán-Contreras, Blanca Aidé. 2017. "Efecto de La Velocidad Superficial Del Gas Sobre La Producción de Hidrógeno Con Vinazas Vitivinícolas." Universidad Nacional Autónoma de México.
- Alshiya, Hisham., Kalil. Sahaid, Alshiyab Hisham. Mohd, Aidil. Abdul Hamid, and Wan. Mohtar Wan Yusoff. 2008. "Trace Metal Effect on Hydrogen Production Using *C.Acetobutylicum*." *OnLine Journal of Biological Sciences* 8(1):1–9.
- Andr, Sergio, Blanco Londo, and Tatiana Rodr. 2012. "Producción de Biohidrógeno a Partir de Residuos Mediante Fermentación Oscura : Una Revisión Crítica ( 1993-2011 ) Biohydrogen Production from Wastes via Dark Fermentation : A Critical Review." *Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería* 20(3):398–411.
- Andreottola, G., P. Foladori, and G. Ziglio. 2009. "Biological Treatment of Winery Wastewater: An Overview." *Water Science and Technology* 60(5):1117–25.
- Angenent, Largus T., Hanno Richter, Wolfgang Buckel, Catherine M. Spirito, Kirsten J. J. Steinbusch, Caroline M. Plugge, David P. B. T. B. Strik, Tim I. M. Grootsholten, Cees J. N. Buisman, and Hubertus V. M. Hamelers. 2016. "Chain Elongation with Reactor Microbiomes: Open-Culture Biotechnology to Produce Biochemicals." *Environmental Science and Technology*.
- Anon. 2015. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.
- APHA/AWWA/WEF. 2012. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater." *Standard Methods* 541.
- Aquino, Sérgio F. and David C. Stuckey. 2008. "Integrated Model of the Production of Soluble Microbial Products (SMP) and Extracellular Polymeric Substances (EPS) in Anaerobic Chemostats during Transient Conditions." *Biochemical Engineering Journal*.
- Arreola-Vargas, Jorge, Felipe Alatríste-Mondragón, Lourdes B. Celis, Elías Razo-Flores, Alberto López-López, and Hugo O. Méndez-Acosta. 2015. "Continuous Hydrogen Production in a Trickling Bed Reactor by Using Triticale Silage as Inoculum: Effect of Simple and Complex Substrates." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*.
- Asociación de Vitivinicultores de Querétaro, 2017. AVQ [WWW Document]. URL <http://www.avq.com.mx/>
- Barragán-Trinidad, Martín, Julián Carrillo-Reyes, and Germán Buitrón. 2017. "Hydrolysis of Microalgal Biomass Using Ruminant Microorganisms as a Pretreatment to Increase Methane Recovery." *Bioresource Technology*.
- Bedoya, Andrea, Juan Esteban Ramírez, Juan Esteban Vásquez, Juan Camilo Castrillón, and Mario Arias. 2007. "Aproximación Al Estado Del Arte Biological Production of Hydrogen : A Literature Survey." *Dyna* 154(3):137–57.

- Benitez, F. Javier, Francisco J. Real, Juan L. Acero, Juan Garcia, and Maria Sanchez. 2003. "Kinetics of the Ozonation and Aerobic Biodegradation of Wine Vinasses in Discontinuous and Continuous Processes." *Journal of Hazardous Materials* 101(2):203–18.
- Blanco Londoño, Sergio Andrés. 2013. "Producción de Biohidrógeno a Través de La Fermentación Oscura de Residuos – Revisión Crítica."
- BP. 2017. "BP Energy Outlook Energy 2017." *BP Statistical Review of World Energy*.
- Buitrón, Germán and Carolina Carvajal. 2010. "Bioresource Technology Biohydrogen Production from Tequila Vinasses in an Anaerobic Sequencing Batch Reactor: Effect of Initial Substrate Concentration , Temperature and Hydraulic Retention Time." *Bioresource Technology* 101(7):9071–77.
- Buitrón, Germán, Gopalakrishnan Kumar, and Gloria Moreno. 2014. "Hydrogen and Methane Production via a Two- Stage Processes ( H<sub>2</sub>-SBR + CH<sub>4</sub>-UASB ) Using Tequila Vinasse ScienceDirect." *International Journal of Hydrogen Energy* 39(11):19249–55.
- Buitrón, Germán, Dorian Prato-Garcia, and Axue Zhang. 2014. "Biohydrogen Production from Tequila Vinasses Using a Fixed Bed Reactor." *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research* 70(12):1919–25.
- Bundhoo, M. A. Zuma. and Romeela Mohee. 2016. "Inhibition of Dark Fermentative Bio-Hydrogen Production: A Review." *International Journal of Hydrogen Energy* 41(16):6713–33.
- Cabrol, Léa, Antonella Marone, Estela Tapia-Venegas, J. P. Steyer, Gonzalo Ruiz-Filippi, and Eric Trably. 2017. "Microbial Ecology of Fermentative Hydrogen Producing Bioprocesses: Useful Insights for Driving the Ecosystem Function." *FEMS Microbiology Reviews* 41:158–81.
- Cao, Xianyan and Youcai Zhao. 2009. "The Influence of Sodium on Biohydrogen Production from Food Waste by Anaerobic Fermentation." *Journal of Material Cycles and Waste Management* 11(3):244–50.
- Cardoso, Vicelmal, Betânia B. Romão, Felipe T. M. Silva, Júlia G. Santos, Fabiana R. X. Batista, and Juliana S. Ferreira. 2014. "Hydrogen Production by Dark Fermentation." *Chemical Engineering Transactions* 38:481–86.
- Cavalcante de Amorim, Eduardo Lucena, Aruana Rocha Barros, Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic, and Edson Luiz Silva. 2009. "Anaerobic Fluidized Bed Reactor with Expanded Clay as Support for Hydrogen Production through Dark Fermentation of Glucose." *International Journal of Hydrogen Energy* 34(2):783–90.
- Carrillo, J., Moreno, I., Buitrón, G., Bovio, P., Braga, A., Braga, L., Castelló, E., Chatellard, L., Cisneros, C., Etchebehere, C., Fuentes, L., Ortega, V., Palomo, R., Razo, E., Ruiz, G., Tapia, E., Trably, E., Wenzel, J., Zaiat, M. (2016) Protocol to evaluate biohydrogen production by dark fermentation in batch test: an international interlaboratory study, XII DAAL, Cuzco, Perú, poster.

- Chapman J, Baker P, Wills S (1998) *Winery Wastewater Handbook*. Winetitles. Broadview SA. [winetitles.com.au/bookstore/ bookstore.asp?action=details&item=361](http://winetitles.com.au/bookstore/bookstore.asp?action=details&item=361)
- Chojnacka, Aleksandra, Mieczysław K. Błaszczyk, Paweł Szczesny, Kinga Nowak, Martyna Sumińska, Karolina Tomczyk-Zak, Urszula Zielenkiewicz, and Anna Sikora. 2011. "Comparative Analysis of Hydrogen-Producing Bacterial Biofilms and Granular Sludge Formed in Continuous Cultures of Fermentative Bacteria." *Bioresource Technology*.
- Ciranna, Alessandro, Roberto Ferrari, Ville Santala, and Matti Karp. 2014. "Inhibitory Effects of Substrate and Soluble End Products on Biohydrogen Production of the Alkalithermophile *Caloramator Celer*: Kinetic, Metabolic and Transcription Analyses." *International Journal of Hydrogen Energy*.
- Consejo Mexicano Vitivinícola, (2017). CMV [WWW Document]. URL <http://uvayvino.org.mx/>
- Das, Debabrata, Tumpa Dutta, Kaushik Nath, Shireen Meher Kotay, Amit K. Das, and T. Nejat Veziroglu. 2006. "Role of Fe-Hydrogenase in Biological Hydrogen Production." *Current Science*.
- Diekert, Gabriele and Gert Wohlfarth. 1994. "Metabolism of Homoacetogens." *Antonie van Leeuwenhoek*.
- Djalma Nunes Ferraz Júnior, Antônio, Jorge Wenzel, Claudia Etchebehere, and Marcelo Zaiat. 2014. "Effect of Organic Loading Rate on Hydrogen Production from Sugarcane Vinasse in Thermophilic Acidogenic Packed Bed Reactors." *International Journal of Hydrogen Energy* 39(30):16852–62.
- Dubois, Michel, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and Fred Smith. 1956. "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." *Analytical Chemistry* 28(3):350–56.
- España-Gamboa, Elda, Javier Mijangos-Cortes, Luis Barahona-Perez, Jorge Dominguez-Maldonado, G. Hernández-Zarate, and Liliana Alzate-Gaviria. 2011. "Vinasses: Characterization and Treatments." *Waste Management & Research: The Journal of the International Solid Wastes and Public Cleansing Association, ISWA* 29(12):1235–50.
- Fernandes, B. S., N. K. Saavedra, S. I. Maintinguer, L. D. Sette, V. M. Oliveira, M. B. A. Varesche, and M. Zaiat. 2013. "The Effect of Biomass Immobilization Support Material and Bed Porosity on Hydrogen Production in an Upflow Anaerobic Packed-Bed Bioreactor." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 170(6):1348–66.
- Ferraz Júnior, Antônio Djalma Nunes, Claudia Etchebehere, and Marcelo Zaiat. 2015. "Mesophilic Hydrogen Production in Acidogenic Packed-Bed Reactors (APBR) Using Raw Sugarcane Vinasse as Substrate: Influence of Support Materials." *Anaerobe*.
- Fuess, Lucas Tadeu, Luma Sayuri Mazine Kiyuna, Marcelo Loureiro Garcia, and Marcelo Zaiat. 2016. "Operational Strategies for Long-Term Biohydrogen Production from Sugarcane Stillage in a Continuous Acidogenic Packed-Bed Reactor." *International Journal of Hydrogen Energy*

41(19):8132–45.

- García-Depraect, Octavio and Elizabeth León-Becerril. 2018. “Fermentative Biohydrogen Production from Tequila Vinasse via the Lactate-Acetate Pathway: Operational Performance, Kinetic Analysis and Microbial Ecology.” *Fuel*.
- García-Depraect, Octavio, Idania Valdez-Vázquez, Eldon R. Rene, Jacob Gómez-Romero, Alberto López-López, and Elizabeth León-Becerril. 2019. “Lactate- and Acetate-Based Biohydrogen Production through Dark Co-Fermentation of Tequila Vinasse and Nixtamalization Wastewater: Metabolic and Microbial Community Dynamics.” *Bioresource Technology*.
- García, Saraí. 2014. “Reformado de Hidrocarburos Logísticos Sobre Cataizadores de NiAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> de Prestaciones Mejoradas.” Universidad del País Vasco.
- Ghimire, Anish, Luigi Frunzo, Francesco Pirozzi, Eric Trably, Renaud Escudie, Piet N. L. Lens, and Giovanni Esposito. 2015. “A Review on Dark Fermentative Biohydrogen Production from Organic Biomass: Process Parameters and Use of by-Products.” *Applied Energy* 144:73–95.
- González, Cesar. and J. Esteban. Durán. 2014. “Producción de Hidrógeno a Partir Del Tratamiento Anaerobio de Vinazas En Un Reactor UASB.” *Tecnología En Marcha* 27:3–12.
- Goud, R. Kannaiyah, S. Veer Raghavulu, G. Mohanakrishna, K. Naresh, and S. Venkata Mohan. 2012. “Predominance of Bacilli and Clostridia in Microbial Community of Biohydrogen Producing Biofilm Sustained under Diverse Acidogenic Operating Conditions.” *International Journal of Hydrogen Energy*.
- Grause, Guido, Masashige Igarashi, Tomohito Kameda, and Toshiaki Yoshioka. 2012. “Lactic Acid as a Substrate for Fermentative Hydrogen Production.” *International Journal of Hydrogen Energy*.
- Van Groenestijn, J. W., J. S. Geelhoed, H. P. Goorissen, K. P. M. Meesters, A. J. M. Stams, and P. A. M. Claassen. 2009. “Performance and Population Analysis of a Non-Sterile Trickle Bed Reactor Inoculated with *Caldicellulosiruptor Saccharolyticus*, a Thermophilic Hydrogen Producer.” *Biotechnology and Bioengineering*.
- Guevara-López, Eliane and Germán Buitrón. 2015. “Evaluation of Different Support Materials Used with a Photo-Fermentative Consortium for Hydrogen Production.” Pp. 17231–38 in *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 40.
- Hallenbeck, Patrick C. and John R. Benemann. 2002. “Biological Hydrogen Production; Fundamentals and Limiting Processes.” Pp. 1185–93 in *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 27.
- IEA. 2017. “World Energy Outlook 2017.” *International Energy Agency*.
- Jeon, Byung Seung, Young Soon Um, Sun Mi Lee, Sang Yeop Lee, Hyoung Juhn Kim, Yong Hwan Kim, Man Bock Gu, and Byoung In Sang. 2008. “Performance Analysis of a Proton Exchange Membrane Fuel Cell (PEMFC) Integrated with a Trickle Bed Bioreactor for Biological High-Rate Hydrogen Production.” in *Energy and Fuels*.

- Jiang, Meiling, Fen Zhang, Cuixiang Wan, Yonghua Xiong, Nagendra P. Shah, Hua Wei, and Xueying Tao. 2016. "Evaluation of Probiotic Properties of *Lactobacillus Plantarum* WLPL04 Isolated from Human Breast Milk." *Journal of Dairy Science*.
- Kim, Tae Hyeong, Yunhee Lee, Kwang Hyeon Chang, and Sun Jin Hwang. 2012. "Effects of Initial Lactic Acid Concentration, HRTs, and OLRs on Bio-Hydrogen Production from Lactate-Type Fermentation." *Bioresource Technology*.
- Krishnan, Santhana, Lakhveer Singh, Mimi Sakinah, Sveta Thakur, Zularisam A. Wahid, and Johan Sohaili. 2016. "Effect of Organic Loading Rate on Hydrogen (H<sub>2</sub>) and Methane (CH<sub>4</sub>) Production in Two-Stage Fermentation under Thermophilic Conditions Using Palm Oil Mill Effluent (POME)." *Energy for Sustainable Development*.
- Lafon Lafourcade, S., E. Carre, and P. Ribereau Gayon. 1983. "Occurrence of Lactic Acid Bacteria during the Different Stages of Vinification and Conservation of Wines." *Applied and Environmental Microbiology*.
- Lay, Chyi-How, Chin-Chao Chen, How-Chih Lin, Chian-Yu Lin, Chia-Wen Lee, and Chiu-Yue Lin. 2010. "Optimal PH and Substrate Concentration for Fermentative Hydrogen Production from Preserved Fruits Soaking Solution." *J. Environ. Eng. Manage* 20(1):35–41.
- Lazaro, Carolina Zampol, Verónica Perna, Claudia Etchebehere, and Maria Bernadete A. Varesche. 2014. "Sugarcane Vinasse as Substrate for Fermentative Hydrogen Production: The Effects of Temperature and Substrate Concentration." *International Journal of Hydrogen Energy* 39(12):6407–18.
- Lee, Dong-Yeol, Yu-You Li, You-Kwan Oh, Mi-Sun Kim, and Tatsuya Noike. 2009. "Effect of Iron Concentration on Continuous H<sub>2</sub> Production Using Membrane Bioreactor." *International Journal of Hydrogen Energy* 34(1):1244–52.
- Lee, Dong-Yeol, Kai-Qin Xu, Takuro Kobayashi, Yu-You Li, and Yuhei Inamori. 2014. "Effect of Organic Loading Rate on Continuous Hydrogen Production from Food Waste in Submerged Anaerobic Membrane Bioreactor." *International Journal of Hydrogen Energy*.
- Lee, Duu Jong, Kuan Yeow Show, and Ay Su. 2011. "Dark Fermentation on Biohydrogen Production: Pure Culture." *Bioresource Technology* 102(18):8393–8402.
- Lee, Kuo Shing, Yung Sheng Lo, Yung Chung Lo, Ping Jei Lin, and Jo Shu Chang. 2004. "Operation Strategies for Biohydrogen Production with a High-Rate Anaerobic Granular Sludge Bed Bioreactor." Pp. 605–12 in *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 35.
- Lim, Seung Joo and Tak Hyun Kim. 2014. "Applicability and Trends of Anaerobic Granular Sludge Treatment Processes." *Biomass and Bioenergy* 60:189–202.
- Lin, Chiu-yue, Chyi-how Lay, Biswarup Sen, and Chen-yeon Chu. 2012. "Fermentative Hydrogen Production from Wastewaters: A Review and Prognosis." *International Journal of Hydrogen*

*Energy* 37(20):15632–42.

- Liu, Dawei. 2008. “Bio-Hydrogen Production by Dark Fermentation from Organic Wastes and Residues.” 60.
- Mejía-Saucedo, Carolina. 2018. “Producción de Biohidrógeno a Partir de Efluentes Vitivinícolas En Sistemas de Biopelícula Con Lecho Estructurado.” Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mohammadi, Parviz, Shaliza Ibrahim, Mohamad Suffian Mohamad Annuar, Maryam Khashij, Seyyed Alireza Mousavi, and Aliakbar Zinatizadeh. 2017. “Optimization of Fermentative Hydrogen Production from Palm Oil Mill Effluent in an Up-Flow Anaerobic Sludge Blanket Fixed Film Bioreactor.” *Sustainable Environment Research* 27(5):238–44.
- Moreno-Andrade, Iván, Gloria Moreno, Gopalakrishnan Kumar, and Germán Buitrón. 2015. “Biohydrogen Production from Industrial Wastewaters.” *Water Science & Technology* 71(1):105.
- Muri, Petra, Romana Marinšek-Logar, Petar Djinović, and Albin Pintar. 2017. “Influence of Support Materials on Continuous Hydrogen Production in Anaerobic Packed-Bed Reactor with Immobilized Hydrogen Producing Bacteria at Acidic Conditions.” *Enzyme and Microbial Technology*.
- Murtey, Mogana Das and Patchamuthu Ramasamy. 2016. “Sample Preparations for Scanning Electron Microscopy – Life Sciences.” in *Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences*.
- Mutturi, S., B. Palmqvist, and G. Lidén. 2014. *Developments in Bioethanol Fuel-Focused Biorefineries*. Vol. 1985.
- Nelson, David L. and Michael M. Cox. 2011. “Principios de Bioquímica de Lehninger.” *Principios de Bioquímica de Lehninger* 1274.
- Nicolaou, Sergios A., Stefan M. Gaida, and Eleftherios T. Papoutsakis. 2010. “A Comparative View of Metabolite and Substrate Stress and Tolerance in Microbial Bioprocessing: From Biofuels and Chemicals, to Biocatalysis and Bioremediation.” *Metabolic Engineering* 12(4):307–31.
- Noblecourt, Alexandre, Gwendoline Christophe, Christian Larroche, and Pierre Fontanille. 2018. “Hydrogen Production by Dark Fermentation from Pre-Fermented Depackaging Food Wastes.” *Bioresource Technology* 247:864–70.
- Nwachukwu, R. E. S., A. Shahbazi, L. Wang, S. Ibrahim, M. Worku, and K. Schimmel. 2012. “Bioconversion of Glycerol to Ethanol by a Mutant Enterobacter Aerogenes.” *AMB Express*.
- Oh, You Kwan, Seo Hyoung Kim, Mi Sun Kim, and Sunghoon Park. 2004. “Thermophilic Biohydrogen Production from Glucose with Trickling Biofilter.” *Biotechnology and Bioengineering*.
- Ohnishi, Akihiro, Yuji Hasegawa, Shinko Abe, Yukiko Bando, Naoshi Fujimoto, and Masaharu Suzuki. 2012. “Hydrogen Fermentation Using Lactate as the Sole Carbon Source: Solution for

‘blind Spots’ in Biofuel Production.” *RSC Advances*.

Oksanen, Author Jari, F. Guillaume Blanchet, Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Dan Mcglinn, Peter R. Minchin, R. B. O. Hara, Gavin L. Simpson, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, Eduard Szoecs, and Helene Wagner. 2016. “Vegan: Community Ecology Package.” <https://Github.Com/Vegandevs/Vegan>.

Parkin, Gene F. and William F. Owen. 1986. “Fundamentals of Anaerobic Digestion of Wastewater Sludges.” *Journal of Environmental Engineering* 112(5):867–920.

Peixoto, Guilherme, Nora Katia Saavedra, Maria Bernadete A. Varesche, and Marcelo Zaiat. 2011. “Hydrogen Production from Soft-Drink Wastewater in an Upflow Anaerobic Packed-Bed Reactor.” *International Journal of Hydrogen Energy* 36(15):8953–66.

Rajagopal, Vadivel, Singh Minhas Paramjit, Kumar P. Suresh, Singh Yogeswar, Rao D. V. K. Nageshwar, and Nirmale Avinash. 2014. “Significance of Vinasses Waste Management in Agriculture and Environmental Quality- Review.” *African Journal of Agricultural Research* 9(38):2862–73.

Dos Reis, Cristiane Marques, Mariana Fronja Carosia, Isabel Kimiko Sakamoto, Maria Bernadete Amâncio Varesche, and Edson Luiz Silva. 2015. “Evaluation of Hydrogen and Methane Production from Sugarcane Vinasse in an Anaerobic Fluidized Bed Reactor.” *International Journal of Hydrogen Energy* 40(27):8498–8509.

Ren, Nan Qi, Jing Tang, Bing Feng Liu, and Wan Qian Guo. 2010. “Biological Hydrogen Production in Continuous Stirred Tank Reactor Systems with Suspended and Attached Microbial Growth.” *International Journal of Hydrogen Energy* 35(7):2807–13.

Rezania, Shahabaldin, Mohd Fadhil Md Din, Shazwin Mat Taib, Johan Sohaili, Shreeshivadasan Chelliapan, Hesam Kamyab, and Bidyut Baran Saha. 2017. “Review on Fermentative Biohydrogen Production from Water Hyacinth, Wheat Straw and Rice Straw with Focus on Recent Perspectives.” *International Journal of Hydrogen Energy* 42(33):20955–69.

Rittmann, B. E. and P. L. McCarty. 2001. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*.

Saady, Noori M. Cat. 2013. “Homoacetogenesis during Hydrogen Production by Mixed Cultures Dark Fermentation: Unresolved Challenge.” *International Journal of Hydrogen Energy*.

Sander, Rolf. 1999. “Compilation of Henry ’ s Law Constants for Inorganic and Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry.” *Database* 13.

Saraphirom, Piyawadee and Alissara Reungsang. 2010. “Effect of Organic Loading Rate on Bio-Hydrogen Production from Sweet Sorghum Syrup by Anaerobic Mixed Cultures in Anaerobic Sequencing Batch Reactor.” *Recent Researches in Energy & Environment*.

Searmsirimongkol, Pawinee, Pramoch Rangsunvigit, Malinee Leethochawalit, and Sumaeth Chavadej. 2011. “Hydrogen Production from Alcohol Distillery Wastewater Containing High Potassium and

- Sulfate Using an Anaerobic Sequencing Batch Reactor.” *International Journal of Hydrogen Energy* 36(20):12810–21.
- Shen, Lihong, David M. Bagley, and Steven N. Liss. 2009. “Effect of Organic Loading Rate on Fermentative Hydrogen Production from Continuous Stirred Tank and Membrane Bioreactors.” *International Journal of Hydrogen Energy*.
- Sikora, Anna, Mieczyslaw Baszczyk, Marcin Jurkowski, and Urszula Zielenkiewicz. 2013. “Lactic Acid Bacteria in Hydrogen-Producing Consortia: On Purpose or by Coincidence?” in *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*.
- Sinha, Pallavi and Anjana Pandey. 2011. “An Evaluative Report and Challenges for Fermentative Biohydrogen Production.” *International Journal of Hydrogen Energy* 36(13):7460–78.
- Stamatelatou, K., G. Antonopoulou, and P. Michailides. 2014. *Biomethane and Biohydrogen Production via Anaerobic Digestion/Fermentation*.
- Tai, Jung, Sunil S. Adav, Ay Su, and Duu-Jong Lee. 2010. “Biological Hydrogen Production from Phenol-Containing Wastewater Using *Clostridium Butyricum*.” *International Journal of Hydrogen Energy* 35(24):13345–49.
- Tang, Jing, Yuan Yuan, Wan Qian Guo, and Nan Qi Ren. 2012. “Inhibitory Effects of Acetate and Ethanol on Biohydrogen Production of *Ethanoligenens Harbinense* B49.” *International Journal of Hydrogen Energy* 37(1):741–47.
- Tymoczko Jeremy M Berg Lubert Stryer T ó ó Barcelona, John L., Buenos Aires, W. H. Freeman, New York, Juan Manuel González Mañas en Ciencias Biológicas, Formación DE Interiores, S. L. Corrección De Textos, Carlos DE Cistué Solá DISEÑO LA CUBIERTA, David Kimura, and Gabriela Varela Propiedad de. 2014. *Bioquímica, Curso Básico*.
- Valdez-Vazquez, Idania and Héctor M. Poggi-Varaldo. 2009. “Hydrogen Production by Fermentative Consortia.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.
- Vinet, Luc and Alexei Zhedanov. 2010. “A ‘Missing’ Family of Classical Orthogonal Polynomials” edited by M. H. Gerardi. *Vasa* 188.
- Vlyssides, A. G., E. M. Barampouti, and S. Mai. 2005. “Wastewater Characteristics from Greek Wineries and Distilleries.” *Water Science and Technology* 51(1):53–60.
- Wang, Bo, Wei Wan, and Jianlong Wang. 2008. “Inhibitory Effect of Ethanol, Acetic Acid, Propionic Acid and Butyric Acid on Fermentative Hydrogen Production.” *International Journal of Hydrogen Energy* 33(23):7013–19.
- Wang, Jianlong and Wei Wan. 2009. “Kinetic Models for Fermentative Hydrogen Production: A Review.” *International Journal of Hydrogen Energy* 34(8):3313–23.
- Wei, Taiyun and Viliam Simko. 2017. “Package ‘corrplot: Visualization of a Correlation Matrix’



(v.0.84).” URL <https://CRAN.R-Project.Org/Package=corrplot>.

- Wibowo, D., R. Eschenbruch, C. R. Davis, G. H. Fleet, and T. H. Lee. 1985. “Occurrence and Growth of Lactic Acid Bacteria in Wine: A Review.” *Am. J. Enol. Vitic.*
- Wu, Shu Yii, Chen Yeon Chu, and Yuan Chang Shen. 2012. “Effect of Calcium Ions on Biohydrogen Production Performance in a Fluidized Bed Bioreactor with Activated Carbon-Immobilized Cells.” *International Journal of Hydrogen Energy* 37(20):15496–502.
- Xu, Ji Fei, Yuan Ting Mi, and Nan Qi Ren. 2016. “Buffering Action of Acetate on Hydrogen Production by *Ethanoligenens Harbinense* B49.” *Electronic Journal of Biotechnology* 23:7–11.
- Yang, Peilin, Ruihong Zhang, Jeffery A. McGarvey, and John R. Benemann. 2007. “Biohydrogen Production from Cheese Processing Wastewater by Anaerobic Fermentation Using Mixed Microbial Communities.” *International Journal of Hydrogen Energy*.
- Yin, Li Li, Shuang Liu, Meng Yi Wang, Wen Cong Ju, Dong Hui Wei, and Wen Zhe Li. 2018. “Formation Process and Properties of Hydrogen-Producing Granular Sludge in UASB Reactor.” *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* 11(5):224–29.
- Yun, J. and K. S. Cho. 2016. “Effects of Organic Loading Rate on Hydrogen and Volatile Fatty Acid Production and Microbial Community during Acidogenic Hydrogenesis in a Continuous Stirred Tank Reactor Using Molasses Wastewater.” *Journal of Applied Microbiology*.
- Zhao, Bai Hang, Zheng Bo Yue, Quan Bao Zhao, Yang Mu, Han Qing Yu, Hideki Harada, and Yu You Li. 2008. “Optimization of Hydrogen Production in a Granule-Based UASB Reactor.” *International Journal of Hydrogen Energy* 33(10):2454–61.
- Zhao, Xin, Defeng Xing, Bingfeng Liu, Lu Lu, Jun Zhao, and Nanqi Ren. 2012. “The Effects of Metal Ions and L-Cysteine on HydA Gene Expression and Hydrogen Production by *Clostridium Beijerinckii* RZF-1108.” *International Journal of Hydrogen Energy* 37(18):13711–17.
- Zheng, Xian Jun and Han Qing Yu. 2005. “Inhibitory Effects of Butyrate on Biological Hydrogen Production with Mixed Anaerobic Cultures.” *Journal of Environmental Management* 74(1):65–70.
- Zwietering, M. H., I. Jongenburger, F. M. Rombouts, and K. Van’t Riet. 1990. “Modeling of the Bacterial Growth Curve.” *Applied and Environmental Microbiology*.