



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL – AIRE

PRODUCCIÓN DE ENERGÍA RENOVABLE EN FORMA DE METANO A PARTIR DE
CORRIENTES DE CO₂ Y H₂

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

PRESENTA:
SIGRID YUNUEN MARES TEPANOHAYA

TUTOR PRINCIPAL
Dr. GUILLERMO QUIJANO GOVANTES, INSTITUTO DE INGENIERÍA
CO-TUTOR Dr. GERMÁN BUITRÓN MENDEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTORAL
Dr. ÓSCAR ARMANDO MONROY HERMOSILLO, UAM-IZTAPALAPA
Dr. ULISES DURÁN HINOJOSA, INSTITUTO DE INGENIERÍA
Dr. DANIEL DE LOS COBOS VASCONCELOS, INSTITUTO DE INGENIERÍA

JURIQUILLA, QUERÉTARO.

OCTUBRE, 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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. Óscar Armando Monroy Hermosillo

Secretario: Dr. Daniel De los Cobos Vasconcelos

1 er. Vocal: Dr. Ulises Durán Hinojosa

2 do. Vocal: Dr. Germán Buitrón Mendez

3 er. Vocal: Dr. Guillermo Quijano Govantes

Lugar donde se realizó la tesis:

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN PROCESOS AVANZADOS DE TRATAMIENTO DE AGUAS, UNIDAD ACADÉMICA JURQUILLA, INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM

TUTOR DE TESIS:

NOMBRE

Dr. Guillermo Quijano Govantes

FINANCIAMIENTO

Esta tesis se llevó a cabo con el apoyo de los siguientes proyectos de investigación:

- Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACYT, a través del proyecto de Investigación Científica Básica A1-S-10079
- Fondo de Sustentabilidad Energética SENER-CONACYT, a través del proyecto 247006 - Clúster de Biocombustibles Gaseosos
- DGAPA-UNAM, a través del Proyecto IA10071

Sigrid Yunuen Mares Tepanohaya agradece la beca de CONACYT para realizar estudios de maestría (Beca #11026).

Agradecimientos

A mis padres Marco Antonio y Margarita por guiarme a hacerme un camino diferente, por enseñarme a no rendirme nunca y a aprender a levantarme con mayor ahincó ante las adversidades. Gracias a ustedes soy el ser humano que soy ahora con virtudes y valores que hoy tengo que fomentar. A mi mani manito por ser mi gran hermano, confidente y amigo en mi vida.

Agradezco profundamente a mi amado esposo David por apoyarme en esta etapa tan importante de mi vida, gracias por ser mi compañero de vida en las buenas y en las malas. Gracias también a mi suegra, Berna por ayudarme incondicionalmente.

Agradezco y dedico este trabajo a mi amado hijo Alexander Otoniel, mi pilar y mi motor que mueve día a día, que gracias al este trabajo ha sido el reto más importante que he vivido.

Guillermo Quijano te agradezco enormemente por enseñarme a ser una profesional en mi trabajo, gracias por brindarme tiempo y dedicación durante esta etapa.

Gracias a todos mis amigos de LIPATA: Gama, Diana, Edith, Lau, Martín, Manu y Rene por vivir momentos tan memorables en las banquitas. Gracias a la Mtra. Gloria y a Jaime por siempre apoyarme dentro y fuera del laboratorio.

Le agradezco al Instituto de Ingeniería, al Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados en Tratamiento de Aguas (LIPATA) y a la Universidad Nacional Autónoma de México por el conocimiento, experiencias y valores que viví en esta nueva etapa de mi vida.

“El éxito no es definitivo, el fracaso no es fatal. Es el coraje para continuar lo que cuenta”

Winston Churchill

Contenido

Índice de figuras.....	1
Índice de tablas.....	2
Nomenclatura.....	3
Resumen.....	4
1. Introducción	5
1.1 Panorama energético actual.....	5
1.2 Biogás como energía renovable.....	7
1.3 Purificación y enriquecimiento de biogás.....	9
1.4 Cofactores en el proceso de metanogénesis hidrogenotrófica.....	16
2. Objetivos	22
2.1 Objetivo general.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 Hipótesis	22
4 Metodología	22
4.1 Cultivo semilla y medio de sales minerales de referencia	22
4.2 Efecto de la concentración de cofactores en el proceso metanogénico hidrogenotrófico	26
4.3 Efecto de la presencia de CH ₄ en el proceso hidrogenotrófico.....	28
4.4 Caracterización de las comunidades microbianas.....	30
4.5 Métodos analíticos.....	30
4.5.1 Análisis de H ₂ , CO ₂ y CH ₄	30
4.5.2 Determinación de sólidos suspendidos volátiles	31
4.6 Análisis estadísticos.....	31
5. Resultados	32
5.1 Enriquecimiento de arqueas hidrogenotróficas-cultivo semilla.....	32
5.2 Efecto de la concentración de cofactores en el proceso metanogénico hidrogenotrófico.....	39
5.3 Efecto de la presencia de CH ₄ en el proceso metanogénico hidrogenotrófico..	48
6 Conclusiones	52
7 Bibliografía	53

Índice de figuras

Figura 1. Producción de petróleo crudo a nivel mundial	6
Figura 2. Proceso de digestión anaerobia	8
Figura 3. Panorama general del proceso de enriquecimiento de biogás por vía hidrogenotrófica acoplado al proceso power-to-gas de generación de H ₂	12
Figura 4. Esquema general del proceso de enriquecimiento de biogás por vía hidrogenotrófica acoplado a digestión anaerobia en dos etapas.	15
Figura 5. Requerimiento de cofactores en la vía metanogénica hidrogenotrófica	19
Figura 6. Botella de vidrio hermética equipada con septo de goma para la toma de muestras líquidas y gaseosas	24
Figura 7. Secuencia experimental para el montaje del cultivo semilla	25
Figura 8. Secuencia experimental para el montaje en el efecto de concentraciones de cofactores	27
Figura 9. Secuencia experimental para el montaje del efecto de la presencia de CH ₄ en el proceso hidrogenotrófico	29
Figura 10. Operación del sistema para la aclimatación y enriquecimiento de las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas	33
Figura 11. Balance de materia de H ₂ , CO ₂ , CH ₄ en el proceso hidrogenotrófico.	34
Figura 12. Consumo de H ₂ en el estudio del efecto de la concentración de cofactores en el proceso hidrogenotrófico.	39
Figura 13. Consumo de CO ₂ en el estudio del efecto de la concentración de cofactores en el proceso hidrogenotrófico.	40
Figura 14. Producción de CH ₄ en el estudio del efecto de la concentración de cofactores en el proceso hidrogenotrófico.	40
Figura 15. Tasa de producción de CH ₄ con respecto a la concentración de cofactores añadido al proceso hidrogenotrófico.	42
Figura 16. Ajuste del modelo de Gompertz a los datos experimentales de concentración de CH ₄ obtenidos con las concentraciones de cofactores estudiadas.	43
Figura 17. Producción de CH ₄ por vía hidrogenotrófica y consumo de H ₂ sin presencia de CH ₄ inicial y con 20% de CH ₄ inicial al inicio del experimento.	49

Figura 18. Ajuste del modelo de Gompertz (línea continua) a los datos 50 experimentales de concentración de CH₄ obtenidos de sin CH₄ y con presencia de CH₄ al inicio del experimento.

Índice de tablas

Tabla 1. Tecnologías fisicoquímicas de enriquecimiento de biogás	10
Tabla 2. Concentración de cofactores reportada en la literatura para la producción de CH ₄ .	17
Tabla 3. Composición del MSM de referencia (1X)	23
Tabla 4. Concentraciones de cofactores a estudiar en el MSM 0X, MSM 0.5X, MSM 1X, MSM 2X, MSM 10X y MSM 20X.	26
Tabla 5. Aclimatación de comunidad microbiana reportada en la literatura para la producción de CH ₄ vía metanogénesis.	36
Tabla 6. Arqueas hidrogenotróficas presentes en el cultivo semilla en el día 104 de operación.	38
Tabla 7. Valores de los parámetros cinéticos del modelo de Gompertz para las concentraciones de cofactores añadidas.	43
Tabla 8. Concentración de SSV en cada concentración estudiada	45
Tabla 9. Concentración específica de Fe, Ni, Zn, Co y Mo en cada sistema estudiado, MSM 0.5X, MSM 1X, MSM 2X, MSM 10X y MSM 20X.	45
Tabla 10. Comparación de resultados obtenidos en el presente trabajo con la literatura	47
Tabla 11. Valores de los parámetros cinéticos del modelo de Gompertz para el efecto de la presencia de CH ₄ en el proceso hidrogenotrófico.	51

Nomenclatura

Parámetro	Definición	Unidades
ANOVA	Análisis de varianza	
α	Nivel de significancia	
MSM	Medio de sales minerales	mg L ⁻¹
H	Concentración total de CH ₄	mL
H _{max}	Concentración máxima de producción de CH ₄	mL
R _{max}	Tasa máxima de producción de CH ₄	mL d ⁻¹
λ	Fase de latencia	d
SSV	Solidos suspendidos volátiles	g L ⁻¹
ppm _v	Partes por millón volumétricas	
F	F de Fisher	
F valor crítico	F de Fisher para el valor crítico	
P	Probabilidad	

Resumen

En el presente trabajo se estudió el efecto de la adición de cinco cofactores en la metanogénesis hidrogenotrófica, así como la presencia de metano en el inicio del proceso. La primera etapa experimental consistió en la aclimatación y enriquecimiento de arqueas hidrogenotróficas utilizando como inóculo, lodo proveniente de un digestor anaerobio. Para este propósito se preparó un medio de sales minerales (MSM) de referencia que contenía las siguientes concentraciones de cofactores (mg L^{-1}): Fe 0.5620; Ni 0.0227; Co 0.0123; Zn 0.0239 y Mo 0.0271. La biomasa hidrogenotrófica enriquecida con el MSM de referencia fue considerada como el cultivo semilla que se utilizó como inóculo para evaluar el efecto de cofactores y la presencia inicial de metano en el proceso hidrogenotrófico. La comunidad microbiana del cultivo semilla se caracterizó por secuenciación masiva de rRNA. En la segunda etapa de experimentación se estudió el proceso hidrogenotrófico utilizando MSM sin añadir cofactores (MSM 0X), MSM de referencia (MSM 1X) y MSM con concentraciones de todos los cofactores de 0.5, 2, 10 y 20 veces con respecto al MSM de referencia. La tercera etapa consistió en el estudio del efecto de la presencia de CH_4 en el inicio del proceso hidrogenotrófico.

Los resultados obtenidos, mostraron que el proceso hidrogenotrófico se llevó a cabo de forma robusta, estable y reproducible después de 19 ciclos de alimentación de CO_2 y H_2 (tiempo de aclimatación y enriquecimiento de 104 días) Se determinó el efecto de las concentraciones añadidas de cofactores al proceso hidrogenotrófico, observándose con MSM 0X y MSM 20X la tasa máxima de producción de metano más baja, 218.78 ± 1.51 y 171.52 ± 3.41 mL d^{-1} , respectivamente. La tasa máxima de producción de metano se obtuvo con MSM 1X y MSM 2X con 262.57 ± 1.27 y 260.12 ± 2.19 mL d^{-1} , respectivamente. La fase de latencia de mayor duración se observó con MSM 0X y MSM 20X (0.83 ± 0.02 y 1.1 ± 0.08 días, respectivamente), mientras que con MSM 1X y MSM 2X se observó la menor duración (0.18 ± 0.02 y 0.21 ± 0.02 días, respectivamente). No se observó inhibición del proceso hidrogenotrófico debido a la presencia de CH_4 , determinándose una tasa máxima de producción de metano de 273.91 ± 2.65 mL d^{-1} en presencia de 20% de CH_4 al inicio del experimento y utilizando MSM 1X.

Palabras clave: arqueas hidrogenotróficas, cinética del proceso, cofactores, enriquecimiento de biogás, metanogénesis hidrogenotrófica.

1. Introducción

1.1. Panorama energético actual

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas, en 2015 la población superó los 7,300 millones de personas y se estima una población de más de 9,000 millones para 2040 (ONU, 2018). Este incremento en la población mundial también se ha visto reflejado en una creciente demanda de energía (IEA, 2017). En este contexto, los combustibles fósiles representan más del 80% del consumo mundial de energía primaria y la demanda sigue en aumento (IEA, 2013). El crecimiento de la población mundial y la creciente demanda de energía han propiciado el desarrollo de nuevas tecnologías para la obtención de energía, así como regulaciones para la reducción de contaminantes de efecto invernadero.

El desarrollo de fuentes alternas de energía ha cobrado mayor impulso en las últimas dos décadas pronosticando un declive en las reservas de petróleo y gas natural en los próximos 20 años (Abas y col., 2015). En la Figura 1 se muestra la producción de petróleo crudo por trimestre a partir de 2016, año que inicia con una producción de 32.53 millones de barriles por día (MMbd), llegando a un máximo de 33.63 MMbd para el último trimestre de 2016 (IEA, 2018). Sin embargo, para el último trimestre de 2017 se observa un descenso notable de la producción de petróleo y gas natural, en el que no se espera que exista un aumento posterior. Por otra parte, la extracción de gas natural en México se redujo 72.33 MMbd de 2014 a 2016 (SENER, 2018). De forma semejante a nivel mundial, de 2010 a 2015 la producción conjunta de gas natural y petróleo crudo pasó de 9.7 a 8.2 MMbd (IEA, 2017).

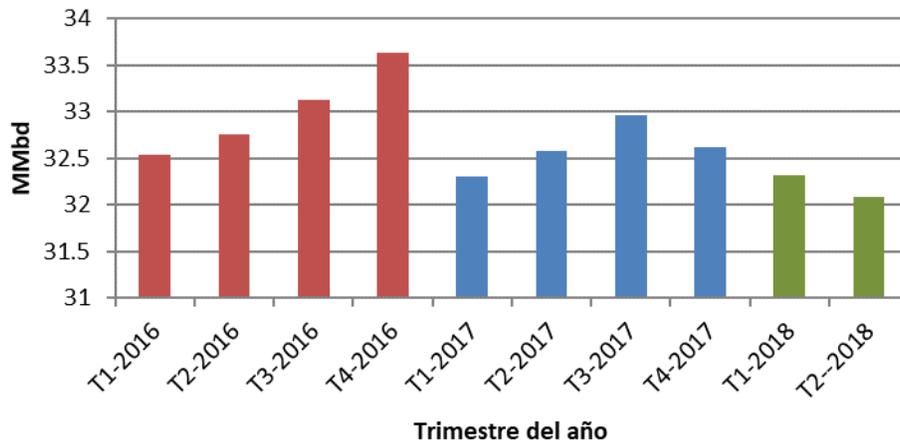


Figura 1. Producción de petróleo crudo a nivel mundial (adaptado de IEA, 2018).

El uso de combustibles fósiles, tanto en su quema como en su extracción, produce efectos colaterales en el medio ambiente y en la salud humana. Tal es el caso de la emisión de gases de efecto invernadero (como CO_2 y CH_4), así como otros gases tóxicos como NO_x y SO_x (involucrados en el fenómeno de la lluvia ácida), los cuales son claros ejemplos de impactos ambientales negativos. De acuerdo con la International Energy Agency, la emisión de CO_2 a nivel mundial, aumentó un 1.4% de 2016 a 2017, lo que representa un aumento de 32.04 gigatoneladas (Gt) por año (IEA, 2017). Mientras que durante el periodo de 1971-2000 hubo un incremento neto de 13.9 a 23.01 Gt, lo que representó un aumento de 0.31 Gt por año (IEA, 2018). Esta comparación indica un incremento en la emisión de gases de efecto invernadero inducidos por las actividades antropogénicas, lo que influye en los rendimientos de alimentos, nutrición y salud humana. Por ejemplo, los efectos del calentamiento global por la emisión de gases de efecto invernadero produce incendios forestales que destruyen cultivos y como resultado se eleva su precio internacional, como en el caso del trigo (McMichael y col., 2013). Por lo tanto, para disminuir los impactos del calentamiento global por emisión descontrolada de gases de efecto invernadero se deben desarrollar tecnologías alternativas para la generación de energía no fósil (IPCC, 2014). Para este fin se deben disminuir drásticamente las emisiones de CO_2 por medio de políticas ambientales adecuadas (IPCC, 2014).

1.2. Biogás como energía renovable

Las energías renovables tienen el potencial para mitigar el cambio climático, además de proporcionar beneficios más amplios, tales como mejorar el acceso al suministro de energía y reducción de impactos tanto ambientales como en la salud (IPCC, 2012). Algunos tipos de energía renovable se pueden utilizar en el punto de generación (sistemas descentralizados), mientras que otros tipos se implementan en grandes redes de energía (sistemas centralizados). De acuerdo con el Intergovernmental Panel on Climate Change, la distribución de fuentes de energía primaria alrededor del mundo se distribuyó de la siguiente manera: gas natural, 22.1%; petróleo, 34.6%; carbón, 28.4%; energía nuclear, 2.0% y energías renovables, 12.9% (IPCC, 2012).

En este contexto, el biogás es un combustible renovable que se compone principalmente de metano (~55-70% v/v) y dióxido de carbono (~30-45% v/v), el cual se obtiene de la descomposición biológica de materia orgánica en condiciones anaerobias (Varnero, 2011). En este proceso biológico, también conocido como digestión anaerobia, la materia orgánica compleja se degrada gracias a la acción conjunta de varios grupos de microorganismos (bacterias y arqueas) como se muestra en la Figura 2. La digestión anaerobia se divide en cuatro etapas diferenciadas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Solera del Rio y col., 2014). La producción de biogás a través de la digestión anaerobia puede llevarse a cabo con diversos efluentes residuales tales como residuos sólidos urbanos, residuos ganaderos, aguas residuales, residuos forestales y residuos agrícolas por lo que puede llevarse a cabo prácticamente en cualquier parte del mundo, utilizando residuos disponibles localmente (Weiland, 2010).

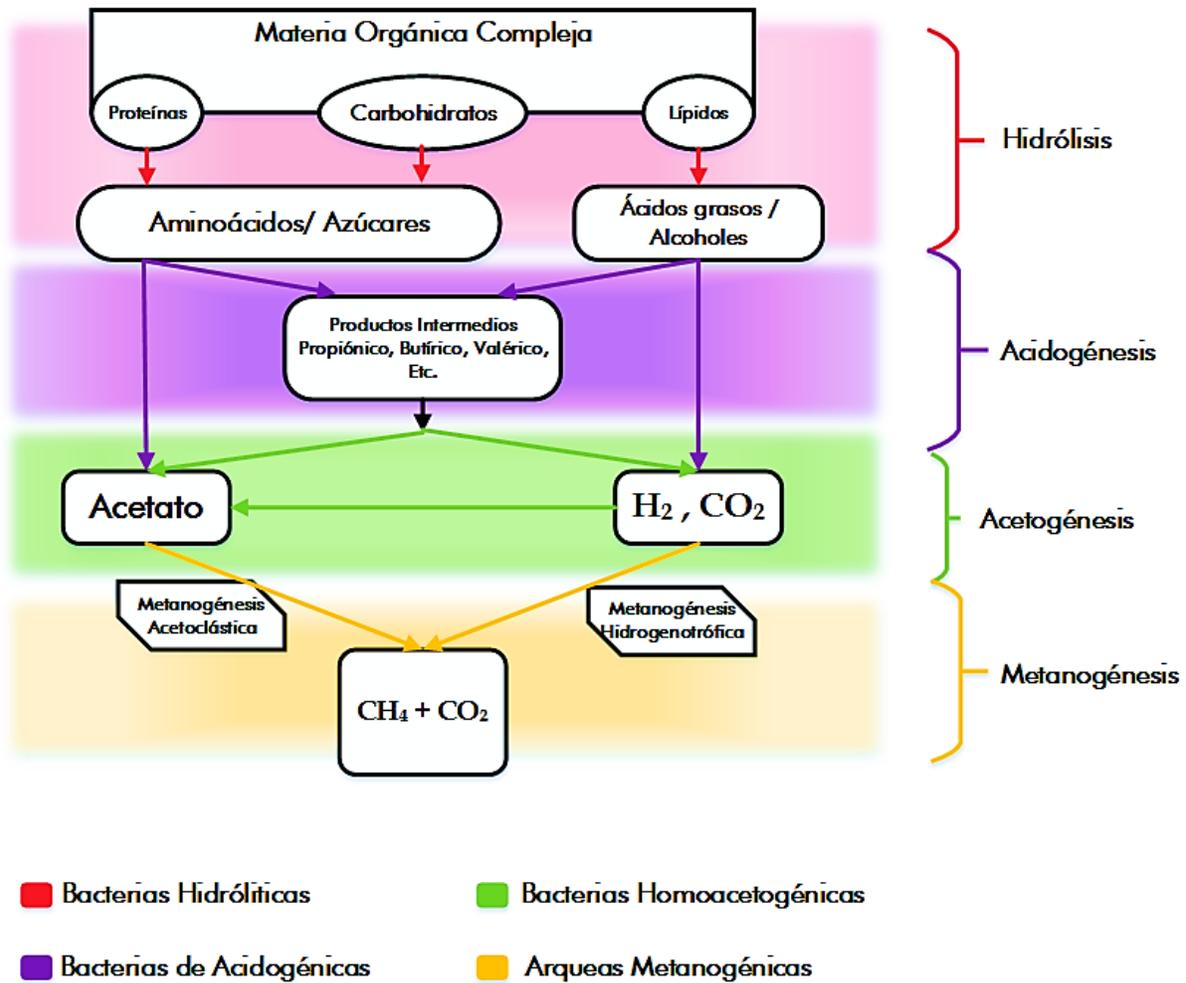


Figura 2. Proceso de digestión anaerobia (adaptada de Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991).

Por consiguiente, en México se estima que se generan 37.5 millones de toneladas anuales de residuos sólidos urbanos, con una composición del 53% de fracción orgánica de acuerdo con datos de la Secretaría de Energía (SENER, 2017). Asimismo, en México se tienen registradas cerca de 2,289 plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas con una capacidad de tratamiento total instalada de 1000 L s⁻¹ (SENER, 2017). En el caso de que los residuos fueran depositados a cielo abierto, una tonelada de RSU produciría aproximadamente 62 m³ de metano mediante la descomposición anaeróbica de la parte biodegradable de los desechos. (SENER, 2017). Entre 2005 y 2015 la capacidad instalada para generación de energía eléctrica por biogás paso de 19.3 MW a 80.8 MW, lo que representó un incremento de 319.1%. Respecto a la producción de electricidad, el

incremento fue de 258.9% en el mismo período, registrando al cierre del 2015 de 203.5 Giga Watts (SENER, 2017). Por lo tanto, en México existe un gran potencial para la producción de biogás por digestión anaerobia. Además, actualmente existe toda una gama de opciones para el aprovechamiento del biogás y la generación de energía térmica y eléctrica a partir de este combustible renovable.

1.3. Purificación y enriquecimiento del biogás

Existen diferentes opciones para el aprovechamiento de biogás, ya sea la generación de energía térmica y eléctrica, o bien utilizarlo como combustible para vehículos (Varnero, 2011). La generación combinada de energía eléctrica y térmica se puede llevar a cabo en motores de ciclo combinado (sistemas CHP). Existe toda una gama de motores CHP que operan a diversos flujos de biogás. Sin embargo, estos sistemas requieren que el biogás esté purificado, limitando las concentraciones de H_2S a 500 ppm_v, NH_3 a 40 ppm_v y metil siloxanos volátiles de entre 0.03 y 28 mg m⁻³ (Arellano y col., 2017). Por lo tanto, la generación de energía térmica y eléctrica a partir de biogás requiere de una etapa de purificación que debe considerarse en el costo total del sistema de aprovechamiento.

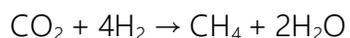
Otro enfoque para el aprovechamiento del biogás es su enriquecimiento hasta alcanzar una concentración de metano $\geq 95\%$ (v/v) mediante la eliminación de CO_2 , el gas resultante se conoce como "biometano" y es un sucedáneo renovable del gas natural (Kadam y col., 2017). Hoy en día existen técnicas fisicoquímicas para la eliminación de CO_2 del biogás, tales como absorción en soluciones alcalinas, separación criogénica, absorción por oscilación de presión y separación por membranas (Sun y col., 2015). La Tabla 1 presenta un resumen de las tecnologías fisicoquímicas más comunes para el enriquecimiento del biogás, sus condiciones de operación y sus fundamentos. Estas tecnologías son costosas ya que operan a altas presiones y/o temperaturas. Además, en los procesos de absorción se requiere una gran cantidad de agua alcalina para la remoción de CO_2 , la cual debe ser tratada posteriormente como un efluente tóxico (Sun y col., 2015). Por esta razón se debe buscar el desarrollo de tecnologías menos costosas y amigables con el medio ambiente.

Tabla 1. Tecnologías fisicoquímicas de enriquecimiento de biogás (Sun y col., 2015; Kadam y col., 2017; Arellano y col., 2017).

Tecnología	Fundamento	Condiciones de operación	Generación de contaminación secundaria
Absorción en soluciones alcalinas	Por medio de solventes alcalinos se disuelve el CO ₂ atrapándolo de la mezcla de gases.	Valores de pH: 9-11 Solventes alcalinos (disoluciones con sales de sodio y potasio).	Sí. Se generan grandes volúmenes de agua contaminada con compuestos químicos.
Separación criogénica	Diferencia de temperaturas para la condensación y destilación del CH ₄ y CO ₂ .	Temperatura -90°C Presión: 40 bar	Sí. Se genera un destilado de CO ₂ que debe gestionarse.
Absorción por oscilación de presión	Absorción de contaminantes a una columna empaquetada a superficies sólidas que son expuestas a altas presiones.	Se emplea presión en función de las características moleculares de la especie a separar.	Sí. Si el proceso no es regenerativo, se genera material absorbente saturado con CO ₂ que debe gestionarse. Principalmente carbón activado.
Separación por membranas	La mezcla de gases se hace pasar por una membrana donde se separa el metano del dióxido de carbono.	Presiones de operación ≥ 15 bar.	No. Material regenerable y/o reutilizable.

En los últimos años se han desarrollado procesos biológicos para el enriquecimiento del biogás por medio de la acción de microorganismos. Estos procesos suelen ser menos costosos que las tecnologías fisicoquímicas, ya que se operan a condiciones de presión y temperatura ambiente (Varnero, 2011). Actualmente existen procesos de enriquecimiento de biogás basados en la acción de microalgas, las cuales, al ser organismos fotosintéticos utilizan el CO₂ como fuente de carbono en presencia de luz (Sun y col., 2015). Estos procesos a gran escala dependen de la radiación solar y suelen acoplarse al tratamiento de aguas residuales (incluyendo el digestato) en el suministro continuo de nutrientes para el crecimiento de las microalgas. De otra forma, los nutrientes deben ser aportados y su costo impacta a la economía del proceso (Meier y col., 2015). Además, los

procesos microalgales pueden utilizarse tanto para remover CO_2 como otros contaminantes como el H_2S , ya que bacterias autotróficas pueden crecer en el mismo sistema y utilizar el O_2 fotosintético para llevar a cabo la oxidación del sulfuro absorbido a sulfato (Meier y col., 2015). Sin embargo, estos procesos dependen de la radiación solar para llevar a cabo el enriquecimiento del biogás y requieren grandes superficies para su instalación, por lo que es recomendable utilizarlos en el sitio donde se produce el biogás (Jankowska y col., 2017). Por lo tanto, estos inconvenientes han impulsado el desarrollo de otras tecnologías biológicas de enriquecimiento del biogás. Tal es el caso de procesos de enriquecimiento de biogás basados en la acción de arqueas. En estos procesos, el CO_2 del biogás es convertido en CH_4 en presencia de H_2 por arqueas hidrogenotróficas de acuerdo con la siguiente reacción (Liu y col., 2008):



Las arqueas desempeñan un papel clave durante el proceso de digestión anaerobia por ser los únicos microorganismos responsables de la producción de metano (Solera del Rio y col., 2014). Las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas se encuentran en el phylum Eurarchaeota y aproximadamente un tercio de la producción de metano proviene de la reducción de CO_2 con H_2 (Glass y col., 2012). Entre los géneros de arqueas metanogénicas hidrogenotróficas conocidas se encuentran *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* y *Methanospirillum* (Liu y col., 2008). De acuerdo con la estequiometría de la reacción y despreciando la producción de biomasa, la producción de metano por vía hidrogenotrófica requiere de una relación estequiométrica 4/1 de H_2/CO_2 .

En este contexto, se busca el aprovechamiento de procesos biológicos en conjunto con otras tecnologías para el enriquecimiento de biogás hasta biometano, el cual puede ser inyectado a redes de gas natural. Estudios recientes han propuesto utilizar los excedentes de energía solar o eólica en sistemas descentralizados para la generación de H_2 por hidrólisis de agua (Götz y col., 2015). Estas corrientes de H_2 tienen un gran potencial para ser utilizadas en procesos hidrogenotróficos de enriquecimiento de biogás (Rachbauer y col., 2016). Así, excesos de energía eléctrica como mini-solar o mini-eólica, que de otra manera se perderían, pueden usarse para hidrolizar agua y generar H_2 almacenable, proceso conocido como "power-to-gas" (Götz y col.,

2015; Rachbauer y col., 2016). La Figura 3 presenta una visión global del enriquecimiento hidrogenotrófico de biogás acoplado al proceso power-to-gas. Los excesos de energía eléctrica se convierten en H_2 , el cual en conjunto con el CO_2 presente en el biogás son los sustratos de arqueas hidrogenotróficas para la generación de CH_4 . El biometano resultante es posteriormente inyectado en la red de gas natural, o bien comprimido para su uso como combustible para vehículos o maquinaria.

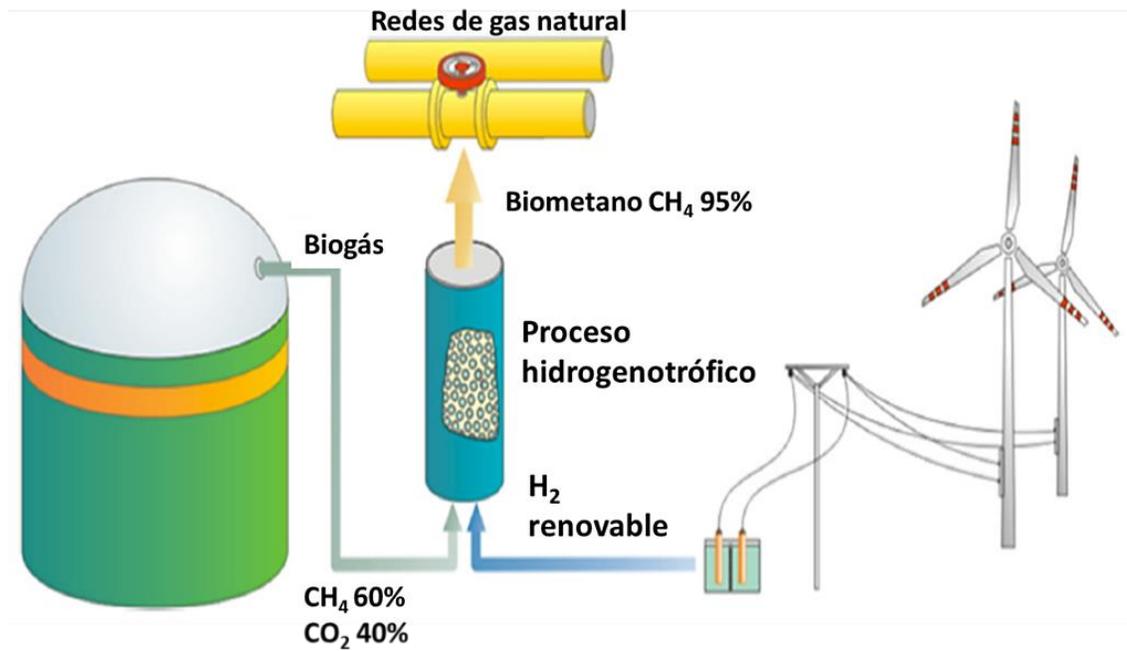


Figura 3. Panorama general del proceso de enriquecimiento de biogás por vía hidrogenotrófica acoplado al proceso power-to-gas de generación de H_2 (adaptado de Rachbauer y col., 2016).

Por otra parte, también se puede obtener H_2 a partir de procesos de digestión anaerobia en dos etapas. La digestión anaerobia puede llevarse a cabo en dos etapas, la primera etapa consiste en la hidrólisis de materia orgánica compleja y formación de ácidos grasos volátiles, proceso que involucra la producción de H_2 (Hosseini., 2019). Se ha propuesto la digestión anaerobia en dos

etapas para efluentes con alto contenido de materia orgánica, así en la primera etapa un biorreactor anaerobio realiza la hidrólisis del sustrato particulado a sustrato soluble, que es acidificado por los ácidos grasos volátiles producidos. El efluente de este biorreactor es alimentado a un segundo reactor metanogénico (Passio y col., 2012). Un valor de pH entre 5-6 es adecuado para la producción de H_2 , el cual es menor del requerido para la producción de CH_4 , que oscila entre 7-8 (Algapani y col., 2019). La disminución de pH en la etapa acidogénica se debe a la acumulación de ácidos grasos volátiles presentes en el sistema, por lo que inhibe la actividad de las arqueas metanogénicas (Zuo y col., 2014) durante la digestión anaerobia tradicional.

La separación en dos etapas busca, por lo tanto, aumentar la estabilidad del proceso de digestión anaerobia, ya que por separado se puede controlar la acidificación para la producción de H_2 y se evita la inhibición de la población metanogénica durante la producción de CH_4 (Fu y col., 2017). En comparación con el proceso tradicional de digestión anaerobia de una sola etapa, cuando se tienen dos etapas se ha reportado que se mejora la eficiencia del proceso en términos de rendimientos de biodegradación, producción energética (ácidos grasos volátiles, H_2 y biogás) y la velocidad de las reacciones (Schievano y col., 2012).

Se han realizado estudios para comparar la digestión anaerobia tradicional contra la digestión anaerobia en dos etapas. Por ejemplo, Fu y col. (2017) realizaron digestión anaerobia en dos etapas en lote, para producción de H_2 y CH_4 a partir de vinazas, obteniendo 214 mL CH_4 g_{SV}^{-1} y 14.8 mL H_2 g_{SV}^{-1} , lo cual corresponde con una recuperación energética de 10.54 kJ g_{SV}^{-1} y una composición del $64.5 \pm 1.4\%$ de CH_4 , mientras que con la digestión anaerobia tradicional se obtuvieron 247 mL CH_4 g_{SV}^{-1} , lo que corresponde con una recuperación energética de 9.34 kJ g_{SV}^{-1} , $58.3 \pm 0.3\%$ de CH_4 , representando un 12.9% más eficiente la digestión anaerobia en dos etapas que la digestión anaerobia tradicional. En el mismo contexto Carrillo-Reyes y col. (2016) a partir de un consorcio de microalgas nativas tratadas bajo hidrólisis térmica-ácida produjeron H_2 y CH_4 de 45 mL H_2 g_{SV}^{-1} y 432 mL CH_4 g_{SV}^{-1} , respectivamente, obteniendo 15.9 kJ g_{SV}^{-1} de recuperación energética, que comparando con Fu y col. la recuperación energética es mayor, demostrando que la digestión anaerobia en dos etapas es un proceso que obtiene un mejor rendimiento en cuestión energética, obteniendo productos gaseosos de interés.

Por otro lado, Arreola-Vargas y col. (2016) a partir de hidrolizados lignocelulósicos hicieron la comparativa entre digestión anaerobia tradicional y digestión de dos etapas encontrando el segundo proceso más eficiente, ya que durante la digestión anaerobia tradicional obtuvo $840 \text{ mL CH}_4 \text{ L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ (litros de metano por litro de reactor por día) con un rendimiento de $420 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1}$ y una recuperación energética de 10 kJ mientras que en digestión anaerobia de dos etapas consiguió $2400 \text{ mL H}_2 \text{ L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ (litros de hidrógeno por litro de reactor por día) y $960 \text{ mL CH}_4 \text{ L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ con una recuperación energética de 14 kJ y con rendimiento de $1200 \text{ mL H}_2 \text{ d}^{-1}$ y $480 \text{ mL CH}_4 \text{ d}^{-1}$. Dareioti y col. (2014) estudiaron el efecto del tiempo de retención hidráulica (TRH) en digestión anaerobia en dos etapas obteniendo grandes volúmenes de H_2 con $1720 \text{ mL H}_2 \text{ L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$ con producción de CH_4 de $330 \text{ mL CH}_4 \text{ L}_R^{-1} \text{ d}^{-1}$. Estos estudios concluyen que la digestión anaerobia en dos etapas es un proceso biológico con interés energético, debido a sus productos como el biogás y H_2 . El biogás puede ser enriquecido para posteriormente ser inyectado a redes de gas natural. Mientras que el H_2 se utiliza para combustible en la rama automotriz, existiendo una problemática: el almacenamiento, ya que se requiere de tanques de gran robustez debido a los grandes volúmenes necesarios (Cipriani y col., 2014). Una forma alternativa de utilización del H_2 es el enriquecimiento del biogás a biometano, utilizando el CO_2 proveniente del biogás y el H_2 proveniente de la etapa acidogénica de la digestión anaerobia en dos etapas, en la cual se lleva a cabo una primera etapa hidrolítica (donde se produce H_2 y ácidos grasos) y una subsecuente etapa metanogénica (Rodríguez-Pimentel y col. 2015; Carrillo-Reyes y col. 2016) (Figura 4).

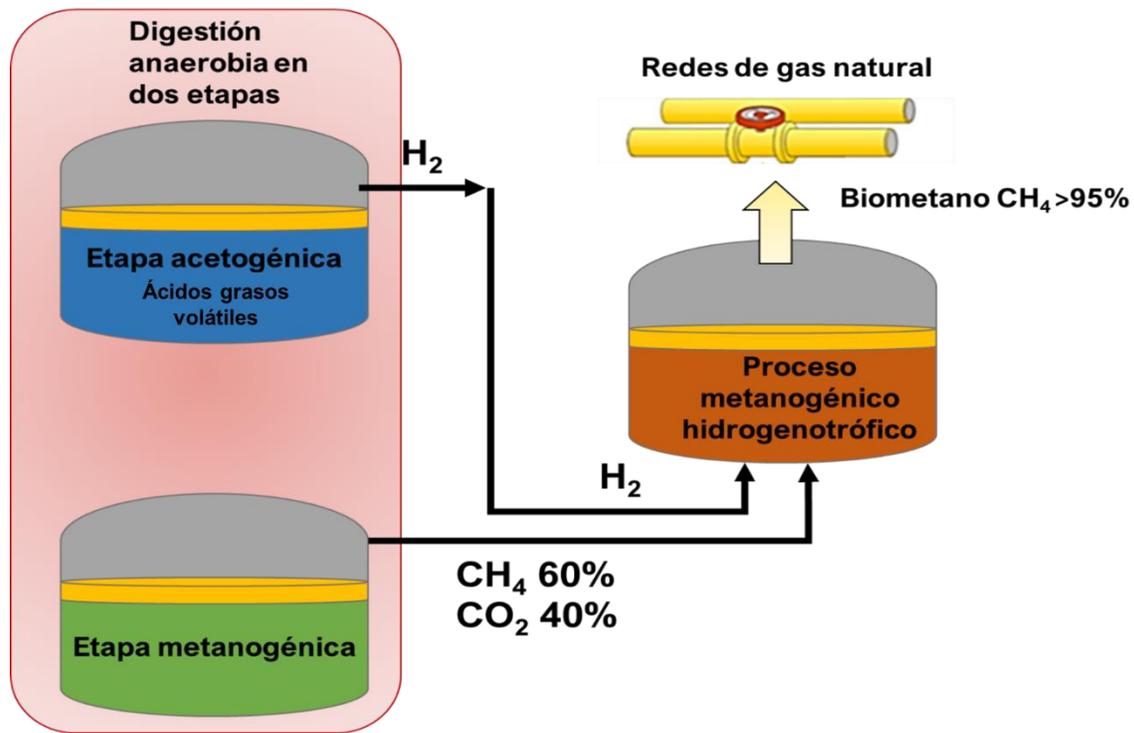


Figura 4. Esquema general del proceso de enriquecimiento de biogás por vía hidrogenotrófica acoplado a digestión anaerobia en dos etapas.

Los pocos estudios sobre procesos metanogénicos hidrogenotróficos reportados en la literatura, indican bajas eficacias de conversión de CO_2 a CH_4 debido a la solubilidad tanto del CO_2 como la baja solubilidad del H_2 en fase líquida (constante adimensional de Henry de 1.27 y 48 para CO_2 e H_2 a 25°C y 1 atm, respectivamente) (Sander, 1999), resultando en severas limitaciones por transferencia de masa (Rittmann y col, 2013). Por otra parte, se han reportado que los procesos hidrogenotróficos son muy sensibles a cambios de pH, por lo que estos sistemas deben tener un control de pH para mejorar el desempeño de las comunidades microbianas que oscila entre 6 y 8.5 (Dupnock y Deshusses., 2017). Por otra parte, en la mayoría de los estudios sobre producción de metano vía proceso hidrogenotrófico no se utiliza biogás sino H_2 y CO_2 como sustratos (Alitalo y col., 2015; Burkhardt y col., 2015; Díaz y col., 2015; Dupnock y Deshusses, 2017). Aunque estas condiciones modelo han aportado información útil para la comprensión del proceso y de los fenómenos de transferencia de masa en diversas configuraciones de reactor, es muy importante estudiar el efecto del CH_4 como parte de la corriente de alimentación del proceso. Debido a que el biogás a enriquecer está compuesto mayoritariamente de metano ($\text{CH}_4 \geq 60\%$), es fundamental

la determinación del efecto del metano en el proceso hidrogenotrófico cuyo producto es precisamente el metano. Por lo tanto, es particularmente relevante identificar una posible inhibición del proceso debido a la alimentación del producto de la reacción.

1.4. Cofactores en el proceso de metanogénesis hidrogenotrófica

Las enzimas son proteínas con actividad catalítica cuyo papel fundamental es acelerar las reacciones biológicas sin modificar el equilibrio de la reacción (Shinya, 2015; Herrera y col., 2014). La actividad catalítica se lleva a cabo en el sitio activo de la enzima, el cual con el entorno químico adecuado permite la interacción entre el sustrato mediante la formación de un complejo binario denominado complejo enzima-sustrato. De acuerdo con Feduchi y col. (2015), las enzimas tienen un componente no proteico denominado cofactor (cationes metálicos) o coenzima (moléculas orgánicas), necesario para su correcto funcionamiento. Numerosas enzimas utilizan cationes metálicos como cofactores, entre los que destacan Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mo^{6+} , siendo los metales divalentes los más requeridos (Primo, 2007). El ion metálico puede actuar como centro catalítico primario, grupo puente para reunir el sustrato y la enzima formando un complejo de coordinación o bien como agente estabilizante de la conformación de la proteína enzimática en su forma catalíticamente activa (Tortora y col., 2007).

En este contexto, en la digestión anaerobia existen grupos específicos de microorganismos responsables de cada fase, los cuales presentan diferentes velocidades de crecimiento siendo la metanogénesis la más lenta (Zabranska y col., 2018). Durante las diferentes etapas de la digestión anaerobia se requieren cofactores, los cuales influyen en la producción de biogás, destacando el hierro (Fe), níquel (Ni), cobalto (Co), Zinc (Zn) y molibdeno (Mo) (Choong y col., 2016; Glass y col., 2012; Wang y col., 2019). Se ha reportado que, en la digestión anaerobia, aproximadamente, un tercio de la producción de metano es por medio de la reducción de CO_2 con electrones de H_2 mientras que el restante es por medio de la oxidación del carbonilo del acetato hasta llegar a CH_4 (Glass y col., 2012). Por lo tanto, es importante suplementar el medio de cultivo con los cofactores necesarios en el proceso hidrogenotrófico, con el fin de evitar bajos rendimientos de conversión debidos a limitación por biorreacción. De acuerdo con Choong y col. (2016), el orden de relevancia

de los cofactores en el proceso de metanogénesis hidrogenotrófica es el siguiente: Fe>>Ni>Zn>Co≈Mo. Glass y col. (2012) reportaron que, dependiendo de la ruta de producción de metano (acetoclástica o hidrogenotrófica), los requisitos de cofactores pueden diferir. Estos estudios concluyen que la variación en la concentración de cofactores durante el proceso puede modificar la producción de metano, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentración de cofactores reportada en la literatura para la producción de CH₄.

Cofactor	Concentración recomendada por Angelidaki y col. (2009) (mg L ⁻¹)	Concentración reportada en la literatura (mg L ⁻¹)	Referencia
Ni	0.0227	0.047	Paulo y col. (2017)
		0.0059	Unal y col. (2012)
		0.085	Glass y col. (2012)
		0.02	Yu y col. (2016)
		0.06	Wang y col. (2019)
Co	0.0123	0.004	Paulo y col. (2017)
		0.047	Unal y col. (2012)
		0.02	Yu y col. (2016)
Fe	0.562	0.847	Unal y col. (2012)
		0.02	Yu y col. (2016)
Zn	0.0239	0.02	Yu y col. (2016)
		0.033	Unal y col. (2012)

La metanogénesis hidrogenotrófica comienza con la reducción de CO₂ al grupo formilo de metanofurano (CHO-MFR), como se muestra en la Figura 5, siendo la ferredoxina reductasa (Fd_{red}) el donador de electrones en la reacción (Enzmann y col., 2018; Zabranska y col., 2018). El requerimiento de Fe es amplio ya que casi todos los complejos enzimáticos involucrados en la ruta requieren de Fe como cofactor (Fig. 5). La primera enzima en la reducción de CO₂, la formilmetanofurano deshidrogenasa (Fmd) puede unirse hasta a nueve grupos Fe₄S₄ con una

unidad de Mo/W y hasta ocho grupos adicionales de poliferredoxina (Poly-Fd). Las ferredoxinas transfieren electrones de H_2 a otras enzimas de metanogénesis las cuales requieren Fe adicional (Glass y col., 2012). Todas las hidrogenasas implicadas en la metanogénesis son enzimas Ni-Fe que oxidan el H_2 y reducen ferredoxina, coenzima F_{420} y otros portadores de electrones (Thauer y col., 2010) y puede contener subunidades adicionales de poliferredoxina (Poly-Fd) con 6 a 14 grupos de Fe_4S_4 (Glass y col., 2012). La coenzima F_{420} , un derivado de la flavina desempeña un papel crítico en dos pasos de transferencia de electrones en la metanogénesis, ya que reduce el H_2 por medio del Frh (F_{420} - hidrogenasa) (Glass y col., 2012).

En la segunda etapa, el grupo formilo se transfiere a tetrahidrometanopterina (H_4MPT) obteniendo $CHO-H_4MPT$. El grupo formilo se deshidrata y se reduce hasta metileno- H_4MPT ($CH=H_4MPT$) con F_{420} reducido (F_{420} deshidrogenasa) como donador de electrones, y posteriormente a metil- H_4MPT utilizando F_{420} hidrogenasas y deshidrogenasas (Enzmann y col., 2018; Zabranska y col., 2018). El complejo de enzimas Frh contiene un sitio activo de Ni-Fe y cuatro grupos de Fe_2S_4 , lo que forma grandes agregados. La Fe hidrogenasa libre de Ni tiene un requerimiento significativamente menor de Fe, ya que utiliza solo dos átomos de Fe por complejo (Thauer y col., 2010).

Las metiltransferasas que contienen Co son esenciales durante la metanogénesis, todas las arqueas utilizan la coenzima metiltransferasa (Mtr) de $CH_3-H_4MPTNi-F$ para conservar energía al transferir el grupo metilo de CH_3-H_4MPT a sulfhidril coenzima M ($HS-CoM$). El complejo de enzimas Mtr contiene dos cofactores de cobamida (con Co cada uno) y ocho átomos de Fe (Glass y col., 2012). Posteriormente el grupo metilo se transporta al portador de electrones adicional, al $HS-CoM$, y se reduce a CH_4 con oxidación simultánea de $HS-CoM$ y sulfhidril coenzima B ($HS-CoB$) para formar el heterodisulfuro de CoM ($CoM-S-S-CoB$). La metil coenzima M reductasa (Mcr), común en todas las vías metanogénicas, cataliza la reducción de $CH_3-S-CoM$ a CH_4 y la formación de heterodisulfuro de CoM-CoB. La siguiente división de electrones tiene lugar en el complejo de heterodisulfuro reductasa, reduciendo el heterodisulfuro: $CoM-S-S-CoB$ a $HS-CoM$ y $HS-CoB$ regenerados y las formas oxidadas de Fd_{ox} a Fd_{red}^{2-} , involucrados en la reducción del CO_2 (Zabranska y col., 2018).

Un parámetro muy importante para la disponibilidad de los cofactores en el proceso hidrogenotrófico es el pH, ya que la solubilización de metales como hierro, níquel, zinc, cobalto y molibdeno dependen de este parámetro. Se ha reportado que los metales antes mencionados requieren de un valor de pH entre 4 y 8 para estar solubles en agua, mientras que a valores de entre 9 y 12 se promoverá la formación de hidróxidos, favoreciendo la precipitación del ion metálico y limitando en consecuencia su disponibilidad (Perelman, 2012).

Existen diferentes estudios que utilizan las sales de los respectivos cofactores para estudiar el efecto de la producción de metano. Se ha estudiado el efecto de dos cofactores o bien de la mezcla de cofactores, tal es el caso de Paulo y col. (2017) quienes estudiaron el efecto del níquel y el cobalto en diferentes concentraciones, obteniendo un incremento de más del 10%, en comparación con su control, en la producción de metano con concentraciones de níquel y cobalto de 0.5 mg L^{-1} y 0.004 mg L^{-1} , respectivamente. Cabe resaltar que el pH utilizado fue de 7, siendo un pH óptimo para las arqueas presentes en el proceso, así como también un valor de pH adecuado para que los metales se solubilizaran en el medio. Yu y col. (2016) estudiaron el efecto de una mezcla de cofactores, hierro, níquel, cobalto, cobre y zinc, sobre la metanogénesis en un biorreactor de membrana anaerobia de dos fases, encontrando el pH óptimo no menor de 7 para un incremento de 7.5% de producción de metano y remoción de demanda química de oxígeno (DQO) del 22.4% en el efecto de la mezcla de cofactores.

Tuo y col. (2014) estudiaron el efecto de zinc en los cambios de comunidad metanogénica en dos reactores UASB encontrando un incremento de metano de más del 20%, controlando un rango de pH de 7.2-7.8. Unal y col. (2012) estudiaron el efecto de cofactores en la actividad metanogénica, destacando el hierro, cobalto, zinc, manganeso (Mn), entre otros cofactores, este estudio se llevó a cabo en botellas serológicas, a las cuales se suministraban como sustratos H_2/CO_2 (80%/20 %) manteniendo un rango de pH entre 7-8, obteniendo un incremento de la producción de metano del 20%. En el caso de Qiang y col. (2012) estudiaron el efecto de hierro, cobalto y níquel en un reactor CSTR donde el pH no fue menor a 7 obteniendo concentraciones de metano en el biogás de más del 50%. En el estudio del efecto de cofactores en la digestión anaerobia destaca el estudio de Zhang y col. (2015) quienes obtuvieron un incremento de la producción de metano (del 10%) en la suplementación de hierro, cobalto, molibdeno y níquel en lote con un rango de pH entre 7-8.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la concentración de cofactores y la presencia de metano en el proceso de metanogénesis hidrogenotrófica enfocado al enriquecimiento de biogás.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Evaluar el efecto en conjunto de la concentración de cofactores (Fe, Ni, Co, Zn y Mo) en la producción de CH_4 por vía hidrogenotrófica.
- 2) Evaluar el efecto de la presencia de CH_4 en el proceso de metanogénesis hidrogenotrófica.
- 3) Caracterizar a las arqueas hidrogenotróficas enriquecidas en el cultivo semilla a partir del lodo anaerobio.

3. Hipótesis

La concentración de cofactores, así como la presencia de CH_4 tendrán un efecto significativo en la velocidad de producción de CH_4 por vía hidrogenotrófica.

4. Metodología

4.1. Cultivo semilla y medio de sales minerales de referencia

Se utilizó como inóculo lodo proveniente de un reactor anaerobio de una empresa harinera (Ingredion México S.A. de C.V., San Juan del Rio, Querétaro). Se preparó un medio de sales minerales (MSM) de referencia con la composición presentada en la Tabla 3 con un pH inicial de 8. El MSM utilizado fue el reportado por Angelidaki y col. (2009), el cual se modificó quitando NaHCO_3 para que la única fuente de CO_2 fuera la suministrada en el espacio de cabeza.

Tabla 3. Composición del MSM de referencia (1X) (modificado de Angelidaki y col., 2009)

Compuesto	Concentración (mg/L)
NH ₄ Cl	1000
NaCl	100
MgCl ₂ · 6H ₂ O	100
CaCl ₂	50
K ₂ HPO ₄	200
KH ₂ PO ₄	200
FeCl ₂ · 4H ₂ O	2
H ₃ BO ₃	0.05
ZnCl ₂	0.05
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.038
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.05
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.05
AlCl ₃	0.05
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.05
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.092
HCl	0.001 mL
Na ₂ SeO ₄	0.139
EDTA	0.5
Biotina	0.002
Ácido fólico	0.002
Ácido piridoxinico	0.01
Ridoflavina	0.005
Cianocobalamina	0.0001
Hidrocloruro de tiamina	0.05
Ácido 5-P aminobenzoico	0.05
Ácido nicótico	0.05
Ácido lipóico	0.05

El MSM de referencia presentado en la Tabla 3 contenía las siguientes concentraciones de cofactores (mg L^{-1}): Fe 0.5620; Ni 0.0227; Co 0.0123; Zinc 0.0239 y Mo 0.0271. El cultivo semilla se llevó a cabo en botellas de vidrio herméticas de 1150 mL de volumen total (250 mL de líquido y 900 mL de espacio de cabeza) (Figura 6). Para garantizar la hermeticidad se colocó teflón al colocar las tapas, así como alrededor de los septos de goma. Las botellas se mantuvieron con agitación a 150 rpm a 37°C.



Figura 6. Botella de vidrio hermética equipada con septo de goma para la toma de muestras líquidas y gaseosas.

El primer paso en la preparación del cultivo semilla fue la desoxigenación del medio para evitar inhibición del proceso hidrogenotrófico. Para este propósito, las botellas contuvieron 225 mL de MSM y 25 mL de lodo anaerobio, como inóculo y se cerraron herméticamente. Posteriormente se aplicó flujo de H_2/CO_2 en proporción 75%/25%, respectivamente, por un tiempo de 10 min. Se agitaron manualmente por 30 s, solo una vez, para garantizar la desoxigenación del medio. Por último, se aplicó flujo de H_2/CO_2 en proporción 75%/25%, respectivamente, por un tiempo de 10 min, de esta manera se obtuvo espacio gaseoso compuesto por H_2/CO_2 exclusivamente. La Figura 6 presenta la secuencia de pasos que se siguió para el montaje del cultivo semilla. Cuando las botellas con el cultivo semilla produjeron CH_4 de forma estable por proceso hidrogenotrófico, se

utilizó esta biomasa como inóculo en todos los ensayos posteriores. Se monitorizaron las concentraciones de CO_2 , H_2 y CH_4 en el espacio gaseoso por cromatografía de gases.

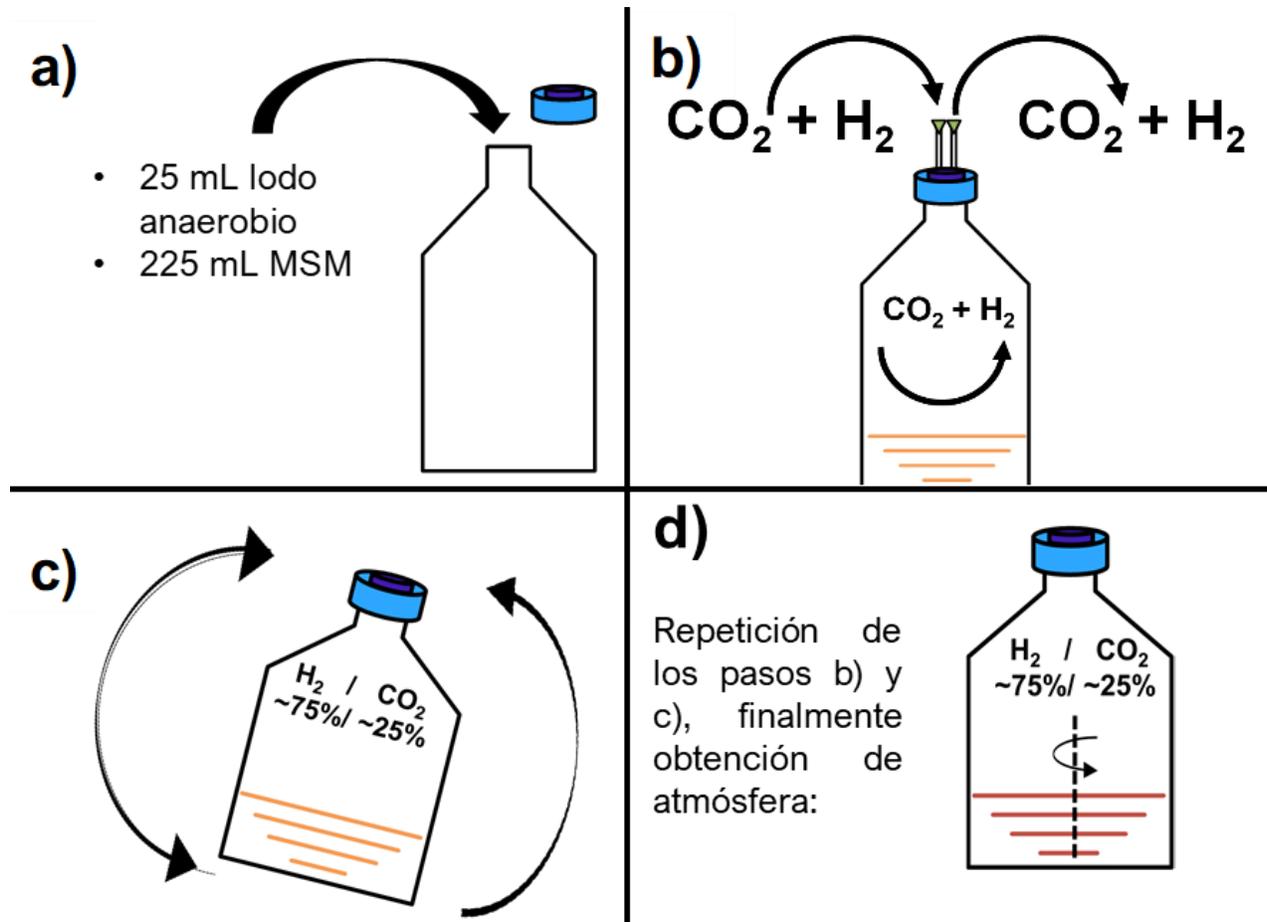


Figura 7. Secuencia experimental para el montaje del cultivo semilla, (a) adición de 225 mL de MSM y 25 mL de inóculo, (b) flujo de mezcla de gases ~75% H_2 y ~25% CO_2 por 10 min, (c) agitación de botella manualmente por 30 s, (d) repetición de los pasos b y c, e incubación a 37°C y 150 rpm.

4.2. Efecto de la concentración de cofactores en el proceso hidrogenotrófico

El efecto de la concentración de cofactores se estudió en botellas de vidrio herméticas de 600 mL de volumen total (200 mL de líquido y 400 mL de espacio gaseoso), las cuales tuvieron el mismo sistema de muestreo presentado en la Figura 6. El primer paso de estos estudios fue la preparación de los medios MSM 0X, MSM 0.5X, MSM 1X, MSM 2X, MSM 10X y MSM 20X los cuales estuvieron suplementados con la concentración de cofactores que se muestra en la Tabla 4, con un pH inicial de 8.

Tabla 4. Concentraciones de cofactores estudiados.

Compuesto	Cofactor	Concentración (mg L ⁻¹)					
		MSM 0X	MSM 0.5X	MSM 1X	MSM 2X	MSM 10X	MSM 20X
FeCl ₂ · 4H ₂ O	Fe	0	0.281	0.562	1.124	5.620	11.240
ZnCl ₂	Zn	0	0.011	0.023	0.048	0.227	0.454
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	Mo	0	0.014	0.027	0.054	0.272	0.544
CoCl ₂ · 6H ₂ O	Co	0	0.006	0.012	0.025	0.123	0.246
NiCl ₂ · 6H ₂ O	Ni	0	0.014	0.027	0.045	0.271	0.542

En estos estudios, se llevaron a cabo controles con MSM 0X, es decir, botellas provistas con MSM al que no se añadió ningún cofactor. Una vez preparados los MSM 0X, MSM 0.5X, MSM 1X, MSM 2X, MSM 10X y MSM 20X los experimentos se llevaron a cabo de manera semejante al cultivo semilla. En este caso, las botellas contenían 20 mL de inóculo (cultivo semilla) y 180 mL de MSM 0.5X, MSM 1X, MSM 2X, MSM 10X o MSM 20X, mientras que los controles contenían 20 mL de inóculo (cultivo semilla) y 180 mL de MSM 0X. Como primer paso se llevó a cabo la desoxigenación de los medios para evitar inhibición del proceso hidrogenotrófico. Para este propósito, las botellas se cerraron herméticamente y se aplicó flujo de H₂/CO₂ en proporción 75%/25% por un tiempo de 5 min. Se agitaron manualmente por 30 s para garantizar la desoxigenación del medio, solo una vez. Se aplicó nuevamente flujo de H₂/CO₂ en proporción 75%/25% por un tiempo de 5 min, de esta manera se obtuvo un espacio gaseoso compuesto por H₂/CO₂ exclusivamente. La Figura 8 presenta la secuencia de pasos que se siguió para el montaje de los cultivos utilizados para

determinar el efecto de la concentración de los cofactores en el proceso hidrogenotrófico. Se monitorizaron las concentraciones de CO_2 , H_2 y CH_4 en el espacio de cabeza por cromatografía de gases.

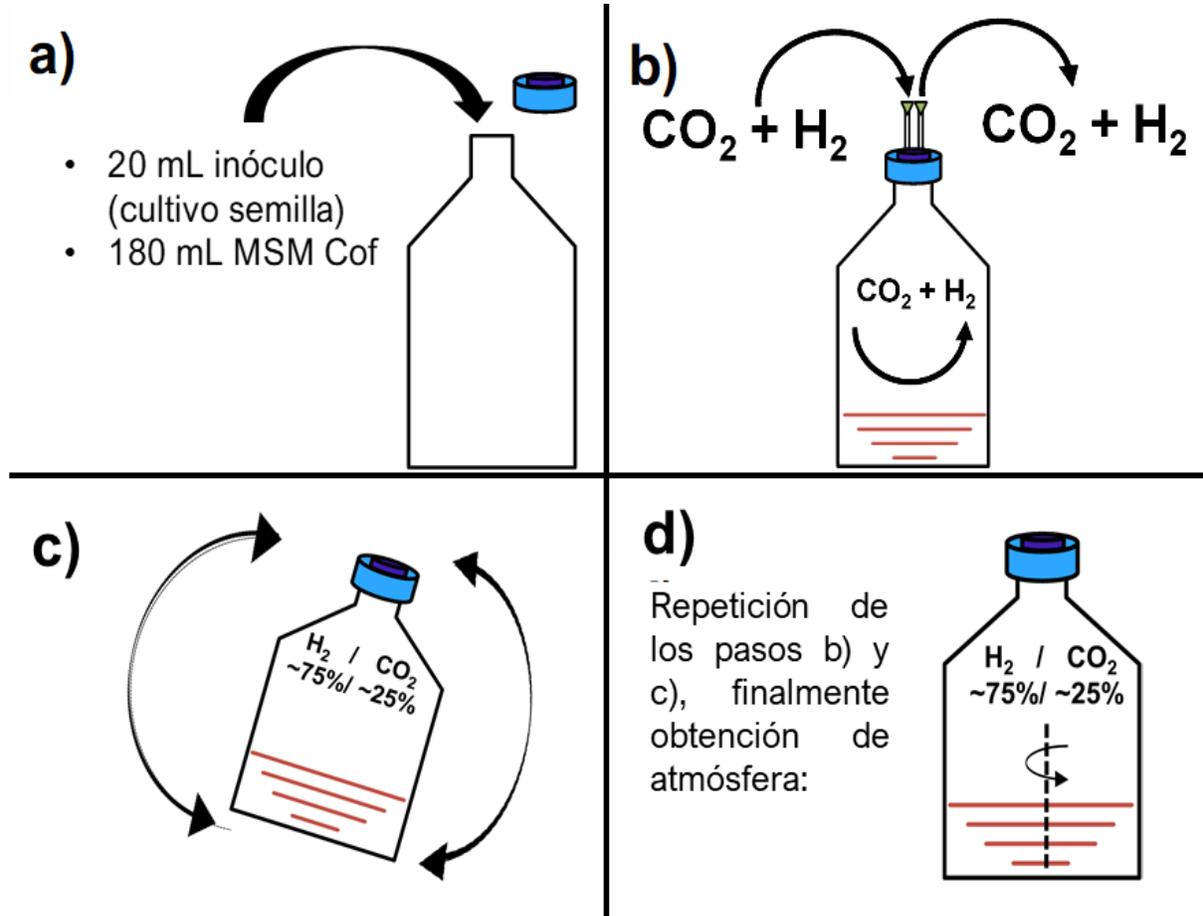


Figura 8. Secuencia experimental para el montaje de las botellas enfocadas al estudio del efecto de concentraciones de cofactores en el proceso hidrogenotrófico, (a) adición de 20 mL de inóculo (cultivo semilla) y 180 mL de MSM 0X, MSM 0.5X, MSM 1X, MSM 2X, MSM 10X o MSM 20X, (b) flujo de mezcla de gases 75% H_2 y 25% CO_2 por 10 min, (c) agitación de botella manualmente por 30 s, (d) repetición de los pasos b y c, e incubación a 37°C y agitación a 150 rpm.

La cinética de producción de CH₄ en cada una de las concentraciones estudiadas se ajustó al modelo de Gompertz modificado (Ecuación 1), donde: H (mL) es la concentración de CH₄ en el tiempo t (días), H_{max} (mL) es la concentración máxima de CH₄, R_{max} (mL d⁻¹) es la tasa máxima de producción de CH₄ y λ (días) es la fase de latencia de los microorganismos. El valor de 2.718 representa el valor de exp (1).

$$\text{Ecuación 1} \quad H = H_{max} * \exp \left\{ -\exp \left[\frac{2.718 * R_{max}}{H_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

4.3. Efecto de la presencia de CH₄ en el proceso hidrogenotrófico

El efecto de la presencia de CH₄ se estudió en botellas de vidrio herméticas de 600 mL de volumen total (200 mL de líquido y 400 mL de espacio gaseoso), las cuales tenían el mismo sistema de muestreo presentado en la Figura 6. En estos experimentos se utilizó MSM 1X (medio de referencia). Se llevó a cabo la desoxigenación del medio para evitar inhibición del proceso hidrogenotrófico. Para este propósito, las botellas contenían 180 mL de MSM y 20 mL de inóculo (cultivo semilla) se cerraron herméticamente y se aplicó flujo de H₂ por un tiempo de 5 min. De esta manera se obtuvo un espacio gaseoso compuesto por H₂ exclusivamente. Finalmente, se removieron 160 mL de H₂ del espacio gaseoso y se inyectó el mismo volumen de una mezcla calibrada de CH₄ y CO₂ (60 y 40%, respectivamente, PRAXAIR, México). De esta forma se obtuvo una atmósfera dentro de la botella con ~60% de H₂, ~16% de CO₂ y ~24% CH₄. Considerando las concentraciones de H₂ y CO₂, se mantuvo una relación cercana a la estequiométrica con una proporción de 3.75 H₂/CO₂. También se realizó un control, para este propósito se prepararon botellas en triplicado conteniendo 180 mL de MSM 1X y 20 mL de inóculo (cultivo semilla) con una atmósfera de H₂ y CO₂ (~75% H₂ y ~25% CO₂). La Figura 9 presenta la secuencia de pasos que se siguió para el montaje de los cultivos utilizados para determinar el efecto de la presencia de CH₄ en el proceso hidrogenotrófico. Las concentraciones de CO₂, H₂ y CH₄ se monitorizaron en el espacio de cabeza por cromatografía de gases. Las cinéticas de producción de CH₄ vía hidrogenotrófica se ajustaron al modelo de Gompertz modificado (Ecuación 1).

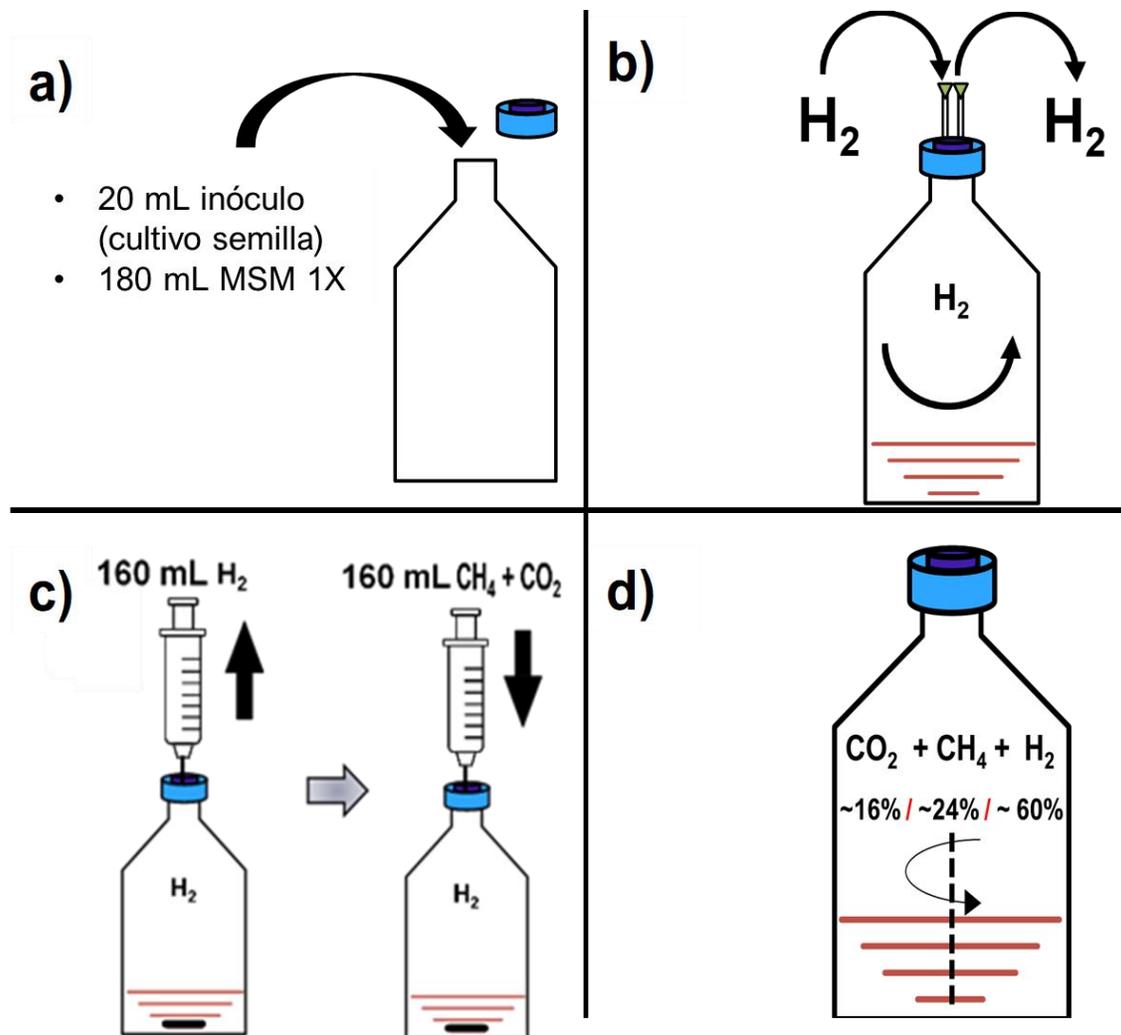


Figura 9. Secuencia experimental para el montaje del efecto de la presencia de CH_4 en el proceso hidrogenotrófico, (a) preparación de botellas con 180 mL de MSM 1X 20 mL de inóculo (cultivo semilla), (b) flujo de H_2 por 5 min, (c) retiro de 160 mL de H_2 posteriormente inyección de 160 mL de la mezcla CH_4+CO_2 , (d) e incubación a $37^\circ C$ y agitación orbital a 150 rpm.

4.4. Caracterización de la comunidad de arqueas hidrogenotróficas en el cultivo semilla

Se tomó una muestra líquida de 30 mL del cultivo semilla el día 104 de operación (producción estable de metano) y se extrajo DNA genómico utilizando el kit PowerSoil® (MOBIO, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de DNA se cuantificó por espectrofotometría utilizando un equipo NANODrop 2000c (Thermo Scientific, Estados Unidos). Las muestras de DNA fueron enviadas al Research and Testing Laboratory (RTL, Lubbock, USA) para el análisis de secuenciación masiva Illumina MiSeq de arqueas (16s rRNA, primers 517F 5'-GCYTAAAGSRNCCGTAGC-3', 909R 5'-GSWCTATCCCCAKCACGA-3'). Las secuencias fueron analizadas utilizando el software QIIME y la selección de unidades taxonómicas operativas se llevaron a cabo utilizando el algoritmo UPERASE de acuerdo con Barragan y col. (2017). El análisis de búsqueda Chimera se realizó en el software UCHIME ejecutando con el modo de novo. La clasificación taxonómica de cada unidad taxonómica operativa se realizó con una secuencia de consenso basada en el clasificador RDP y comparada con secuencias de la base de datos NCBI.

4.5. Métodos analíticos

4.5.1. Análisis de H₂, CO₂ y CH₄

Las concentraciones de H₂, CO₂ y CH₄ se determinaron en fase gaseosa por medio de cromatografía de gases (8610C, SRI Instruments, Torrance, CA, EUA) usando N₂ como gas acarreador a una presión de 50 psi. El cromatógrafo estuvo equipado con un detector de conductividad térmica (TCD), una columna empacada con sílice gel de 6'x 1/8'' y una columna empacada con tamiz molecular 13x. El inyector y detector se mantuvieron a 90 y 150°C, respectivamente. La temperatura inicial del horno fue de 40°C, la cual se mantuvo por 4 min y se incrementó a 110°C a razón de 20°C min⁻¹. La temperatura final en la columna se mantuvo por 3 min. Las muestras de H₂, CO₂ y CH₄ se tomaron a través del septo de goma que tenían las botellas de vidrio por medio de una jeringa (Figura 6).

4.5.2. Determinación de sólidos suspendidos volátiles

La concentración de biomasa se determinó experimentalmente en términos de sólidos suspendidos volátiles (SSV). Los SSV se determinaron como se indica a continuación. Como primer paso se enjuagaron filtros con diámetro de 55 mm (Whatman, Reino Unido) con 10 mL de agua destilada, después se llevaron los filtros a la mufla a 550 °C por 20 min y posteriormente se trasladaron a la estufa a 105°C por 24h. Se dejaron enfriar los filtros, posteriormente se pesaron hasta llegar a peso constante (m_1), subsecuentemente, se filtraron 10 mL de la muestra. Se trasladaron los filtros con muestra a la estufa con temperatura de 105°C por 24 h, se dejaron enfriar y se registró el peso (m_2), por último, se llevaron los filtros a la mufla con temperatura de 550°C por 20 min, se dejaron enfriar y se registró el peso (m_3). Para calcular la concentración de SSV se utilizó la Ecuación 2:

$$\text{Ecuación 2} \quad SSV \left(\frac{g}{L} \right) = \left(\frac{m_3 - m_2 (g)}{\text{Volumen (L) de la muestra}} \right) * 1000$$

4.6. Análisis estadísticos

Para determinar diferencias significativas en los valores promedio de cada uno de los parámetros del modelo de Gompertz (H_{max} , R_{max} , λ) se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con $\alpha = 0.05$. El ANOVA considera que $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$ y $H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \dots \neq \mu_n$, donde μ representa el valor medio del parámetro i . La prueba de Tukey se realizó cuando H_0 fue rechazada. Tanto el ANOVA como la prueba de Tukey se realizaron con Excel Office 365 (Microsoft).

5. Resultados

5.1. Enriquecimiento de arqueas hidrogenotróficas – cultivo semilla

En la Figura 10 se muestra el consumo de H_2 y CO_2 durante la aclimatación y enriquecimiento de arqueas hidrogenotróficas, así como la producción de CH_4 a partir del día 85 del cultivo semilla. Antes del día 85, no se observó un consumo significativo de H_2 , se observó un consumo parcial de H_2 hasta el día 94 donde la concentración mínima de H_2 fue de 72.8%. Este consumo limitado de H_2 se vio reflejado en una producción de CH_4 máxima del 47.7%. A partir del día 104 en adelante, ya se observó un consumo total del H_2 , resultando producción de CH_4 de forma reproducible y robusta en ciclos posteriores con renovación de H_2 y CO_2 en el espacio de cabeza con una producción estable de CH_4 del 78%, aproximadamente. Mientras que, en el mínimo consumo de CO_2 se atribuyó a que el CO_2 es el gas más soluble del proceso hidrogenotrófico y, por lo tanto, una mayor proporción de este sustrato se disolvió en el líquido. Cabe resaltar que la renovación del espacio de cabeza con H_2 y CO_2 fue en ciclos de 2 o 3 días, tal y como se muestra en la Figura 10.

Durante el periodo de aclimatación se midió periódicamente el pH de la fase líquida, obteniendo valores entre 7.55 y 7.76 durante la producción estable de CH_4 . Estos valores de pH están dentro del intervalo reportado como óptimo de acuerdo con Dupnock y Deshusses (2017), quienes observaron que el proceso hidrogenotrófico se lleva a cabo de forma adecuada a valores de pH entre 6.0 y 8.5, pero son más favorables valores de pH entre 7 y 8, puesto que a valores por encima de 8 las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas son menos activas (Burkhardt y col., 2013).

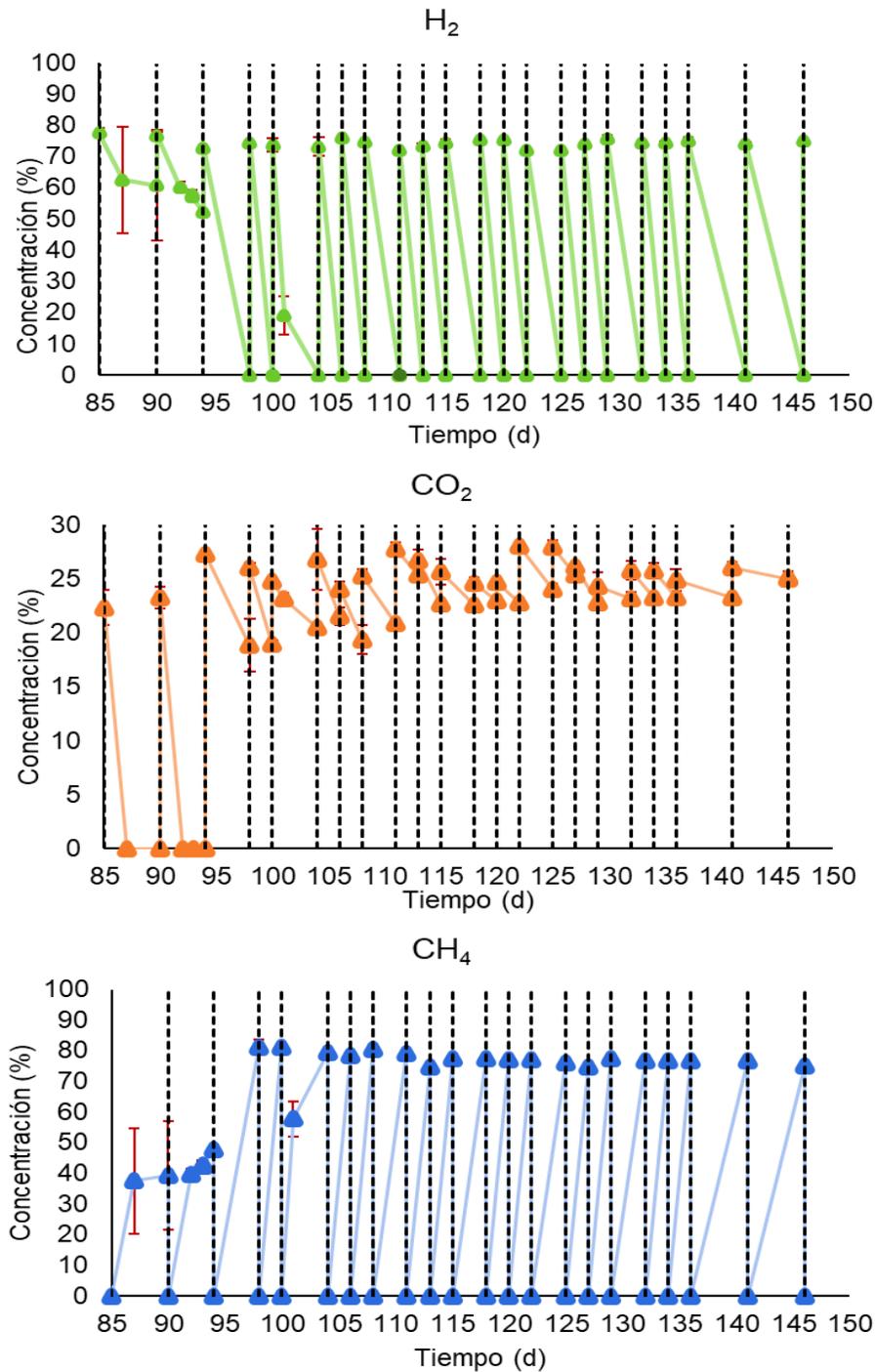


Figura 10. Operación del sistema para la aclimatación y enriquecimiento de las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas, donde se muestra el consumo de H₂ y CO₂, así como la producción estable de CH₄. Las líneas horizontales punteadas indican renovación del espacio de cabeza con H₂ y CO₂.

En la Figura 11 se muestra el balance de masa en el proceso metanogénico hidrogenotrófico, se consideró la estabilidad del proceso, como se muestra en la Figura 10, por lo que el balance de masa se calculó a partir del día 100 al día 104. Cabe mencionar que el día 100 fue el inicio de un ciclo del proceso finalizando el ciclo el día 104. Se puede observar que los moles iniciales de H_2 y CO_2 fue de 11.8 ± 0.33 mmol y 7.8 ± 0.0 mmol, respectivamente, produciendo 12.27 ± 0.01 mmol de CH_4 . En el proceso se observó que el reactivo limitante fue el H_2 ya que se consumió en su totalidad en el proceso, corroborándose en el balance de masa.

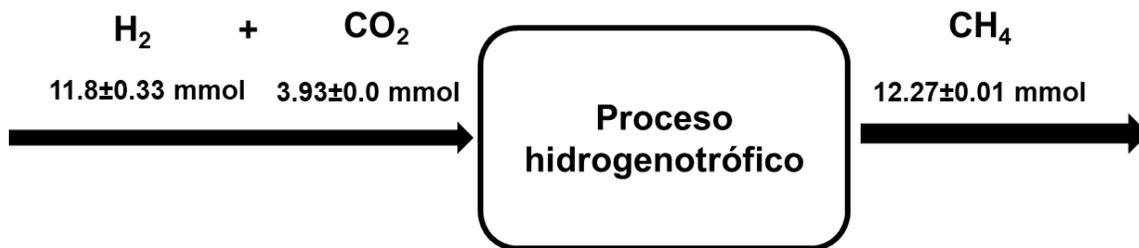


Figura 11. Balance de materia de H_2 , CO_2 y CH_4 en el proceso hidrogenotrófico.

Al inicio del proceso se determinaron los sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el inoculo, obteniendo una concentración de $11.45 \text{ g}_{SSV} \text{ L}^{-1}$ al día 0 del proceso, es importante mencionar que no todos los SSV presentes en el lodo granular anaerobio son arqueas, existiendo también diversas bacterias. Al día 104 se observó estabilidad en el proceso hidrogenotrófico por lo cual se tomó muestra para la determinación de los SSV, obteniendo $3.8 \pm 0.19 \text{ g}_{SSV} \text{ L}^{-1}$, observando una disminución de SSV, sin embargo, se obtuvo con eficiencia biomasa con la presencia de arqueas metanogénicas hidrogenotróficas responsables de la estabilidad y robustez del proceso en el presente trabajo. El análisis correspondiente de las arqueas hidrogenotróficas encontradas en el proceso se describirá más adelante.

En la literatura se han reportado sistemas en lote y en continuo para el enriquecimiento y aclimatación de arqueas hidrogenotróficas (Tabla 5). Por ejemplo, Rauchbauer y col. (2016) realizaron la aclimatación de lodo anaerobio en un biofiltro percolador, obteniendo el enriquecimiento de arqueas hidrogenotróficas después de 47 días de operación, con alimentación de H_2 y CO_2 . Burkhardt y col. (2015) utilizaron inoculo proveniente de un biofiltro percolador, obteniendo el enriquecimiento de arqueas hidrogenotróficas después de 89 días de operación.

Mientras que, Ojeda y col. (2017) llevaron a cabo el enriquecimiento de lodo anaerobio en un biorreactor de membrana HM-AD después de 33 días de operación. Luo y col. (2012) lograron la aclimatación de las arqueas hidrogenotróficas a partir de lodo anaerobio, en ensayos en lote con alimentación de H_2 y CO_2 , en un periodo de 45 días. También se han reportado tiempos más prolongados para la aclimatación, por ejemplo, Unal y col. (2017) quienes, a partir de lodo anaerobio, con alimentación de H_2 y CO_2 (80%/20%, respectivamente) consiguieron enriquecer arqueas hidrogenotróficas en 80 días, sin embargo, el desempeño estable y reproducible se observó sólo después de dos años. En el presente trabajo se llevó a cabo la aclimatación y enriquecimiento de arqueas hidrogenotróficas a partir de lodo granular anaerobio en ensayos en lote con alimentación exclusiva de H_2 y CO_2 por varios ciclos de operación en un periodo de 104 días. El proceso hidrogenotrófico reproducible se observó a partir del día 104. Cada uno de los sistemas presentados en la Tabla 5 tiene diferentes variables de operación que influyen en el enriquecimiento de las arqueas hidrogenotróficas, tales como el tipo de operación (adición de H_2 y CO_2 de forma continua o discontinua), temperatura o tipo de inóculo. Por lo tanto, es difícil comparar los tiempos de enriquecimiento y de obtención de un proceso hidrogenotrófico estable y reproducible, pero de forma general, la obtención de arqueas hidrogenotróficas es un proceso lento que debe llevarse bajo condiciones controladas.

Tabla 5. Aclimatación de comunidad microbiana reportada en la literatura para la producción de CH₄ vía metanogénesis.

Inóculo	Condiciones de operación	Suministro de H ₂ y CO ₂	Tiempo para observar producción estable de CH ₄	Referencia
Lodo anaerobio	Biofiltro percolador, 37°C	Continuo	47 días	Rauchbauer y col. (2016)
Lodo anaerobio digestor anaerobio	Biofiltro percolador 37°C	Continuo	89 días	Burkhardt y col. (2015)
Lodo anaerobio digestor anaerobio	Biorreactor de membrana HM-AD 35°C	Semi-continuo	33 días	Ojeda y col. (2017)
Lodo anaerobio digestor anaerobio	Botellas de vidrio 37°C 300rpm	Lote	45 días	Luo y col. (2012)
Lodo anaerobio digestor anaerobio	Botellas serológicas 29.6°C Sin agitación	Lote	2.5 años	Unal y col. (2012)
Lodo granular de digestor anaerobio	Botella de vidrio 37°C 150 rpm	Lote	104 días	Presente trabajo

A continuación, se presenta el análisis de las arqueas hidrogenotróficas encontradas en la etapa de enriquecimiento. En la Tabla 6 se presenta en resumen las arqueas predominantes en el proceso con su respectiva abundancia relativa. Se observa que, las clases predominantes de arqueas fueron *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales*, mientras que, la clase *Methanosarcinales* se encontró en menor proporción. Entre los *Methanobacteriales* se encontró la especie *Methanobacterium sp*, con una abundancia relativa del 28.15%, esta especie es reportada como arquea hidrogenotrófica (Park y col. 2010). Mientras que, entre los *Methanomicrobiales* se encontró la especie *Methanolinea sp* y *Methanospirillum sp* con abundancia relativa de 67.16% y 0.11%, respectivamente. La *Methanolinea sp* es una arquea hidrogenotrófica que crece a temperatura de 35-55°C y pH de 6.7-8 (Imachi y col. 2008). *Methanospirillum sp* (0.11%) es otra arquea hidrogenotrófica que crece en temperatura de 30-40°C y pH de 6.5-7.4 (Gunsalus y col. 2016). Otra especie de arquea encontrada fue la *Methanosarcina sp* (0.17%), arquea hidrogenotrófica capaz de crecer a temperatura de 30-45°C y pH 5-7.4 (Lambie y col. 2015).

La arquea hidrogenotrófica con mayor abundancia en el presente trabajo fue la *Methanolinea sp*, arquea reportada en el trabajo de Unal y col. (2012) en donde se llevó a cabo el enriquecimiento de lodo anaerobio granular bajo condiciones hidrogenotróficas, esta arquea es conocida por tomar como sustratos H₂ y CO₂ bajo condiciones anaerobias estrictas. Mientras que Paulo y col. (2017) encontraron en gran abundancia a esta arquea bajo condiciones hidrogenotróficas y con bajo o alto requerimiento de cofactores. De acuerdo con esta literatura indica que, en el presente trabajo se encontró de una arquea hidrogenotrófica ampliamente reportada. Mientras que la segunda arquea con mayor predominancia fue la *Methanobacterium sp*, reportada también como arquea hidrogenotrófica de acuerdo con Unal y col. (2012). La tercer arquea predominante es del orden la familia *Methanobacteriaceae* (género y especie no identificados). La cuarta arquea predominante es del orden *Methanomicrobiales* (familia, género y especie no identificados). La quinta arquea predominante es del orden *Methanobacteriales* (familia, género y especie no identificados). Las arqueas con menor abundancia relativa, fueron *Methanosarcina sp* y *Methanospirillum sp*, arqueas reportadas ampliamente en la literatura (Luo y col., 2012; Unal y col., 2012; Bassani y col. 2015). En el presente trabajo se obtuvieron con éxito el enriquecimiento de arqueas hidrogenotróficas reportadas en la literatura, lo que explica cómo se obtuvo una alta concentración de CH₄ en el cultivo semilla, así como también se explica la producción estable y robusta de CH₄.

Tabla 6. Arqueas hidrogenotróficas presentes en el cultivo semilla en el día 104 de enriquecimiento.

Dominio > Filo > Clase > Orden > Familia > Género > Especie	Abundancia relativa
<i>Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanomicrobiales; Methanoregulaceae; Methanolinea; Methanolinea sp</i>	67.16
<i>Archaea; Euryarchaeota; Methanobacteria; Methanobacteriales; Methanobacteriaceae; Methanobacterium; Methanobacterium sp</i>	28.15
<i>Archaea; Euryarchaeota; Methanobacteria; Methanobacteriales; Methanobacteriaceae; Unclassified; Unclassified</i>	2.21
<i>Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanomicrobiales; Unclassified; Unclassified; Unclassified</i>	1.31
<i>Archaea; Euryarchaeota; Methanobacteria; Methanobacteriales; Unclassified; Unclassified; Unclassified</i>	0.88
<i>Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanosarcinales; Methanosarcinaceae; Methanosarcina; Methanosarcina sp</i>	0.17
<i>Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia; Methanomicrobiales; Methanospirillaceae; Methanospirillum; Methanospirillum sp</i>	0.11

5.2. Efecto de la concentración de cofactores en el proceso metanogénico hidrogenotrófico

Una vez obtenido el cultivo semilla con actividad hidrogenotrófica reproducible y estable, se llevó a cabo el estudio del efecto de la concentración de cofactores de 0X, 0.5X, 1X, 2X, 10X y 20X en el proceso hidrogenotrófico. En la Figura 12 se puede observar que el consumo de H_2 es total en cada uno de los experimentos estudiados, sin embargo, existen diferencias en cuanto el periodo de consumo de H_2 . Los experimentos de 0.5X, 1X y 2X consumieron totalmente el H_2 en 2 días, mientras que los experimentos de 0X y 10X consumieron el H_2 en un tiempo de 3 días, siendo el experimento de 20X el más lento en el consumo de H_2 con un tiempo de 7 días. Cabe resaltar que el CO_2 medido en la fase gaseosa no se consumió por completo bajo ninguna condición estudiada (Figura 13). Esto se atribuyó a que el CO_2 es el gas más soluble del proceso hidrogenotrófico y, por lo tanto, una mayor proporción de este sustrato se disolvió en el líquido, además, se determinó que el reactivo limitante en el proceso fue el H_2 . Por lo tanto, el análisis de la cinética de los cultivos se basó en datos de producción de metano y se confirmó el proceso hidrogenotrófico por el consumo de H_2 .

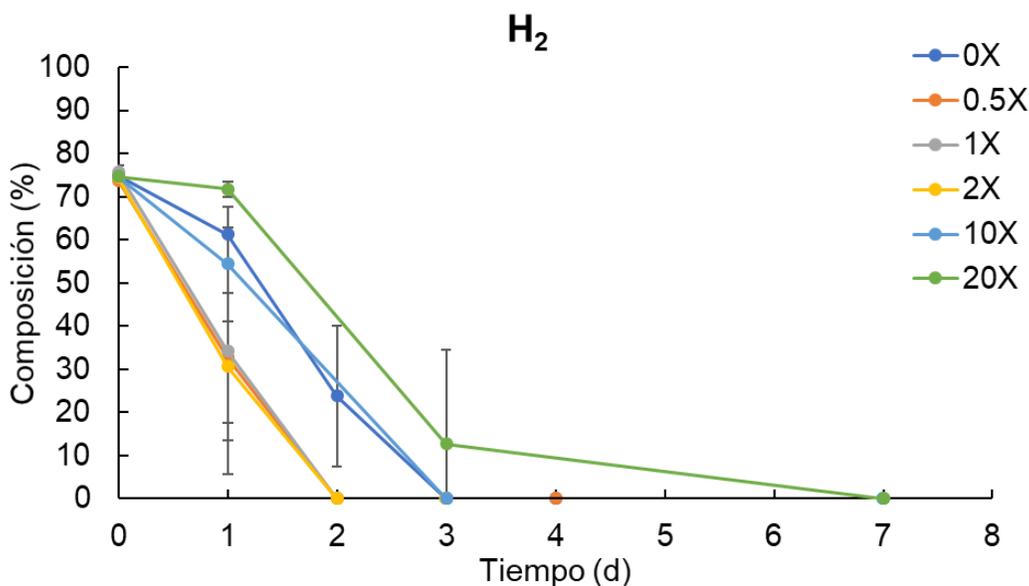


Figura 12. Consumo de H_2 en el estudio del efecto de la concentración de cofactores en el proceso hidrogenotrófico.

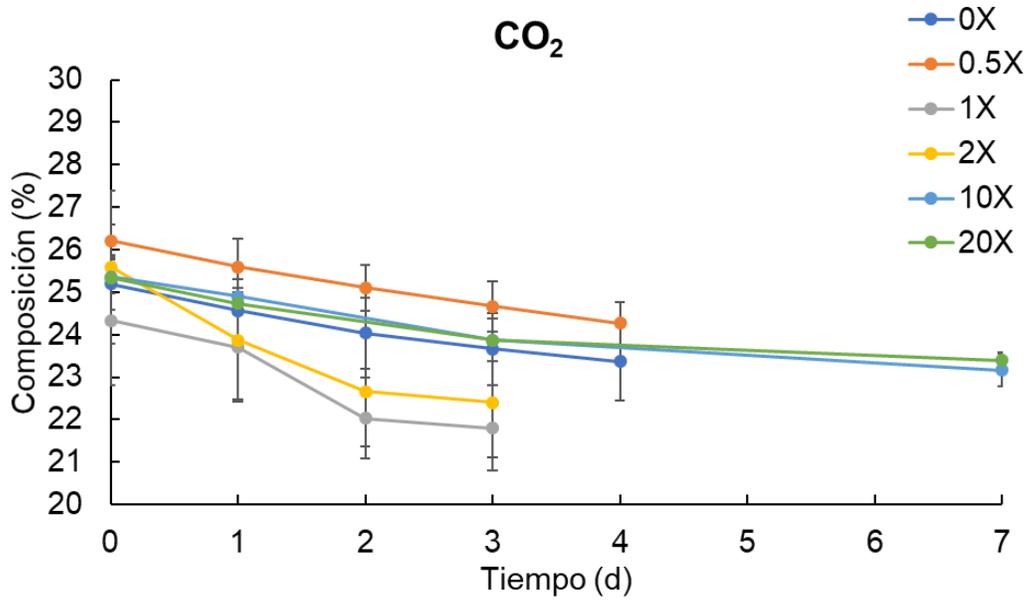


Figura 13. Consumo de CO₂ en el estudio del efecto de la concentración de cofactores en el proceso hidrogenotrófico.

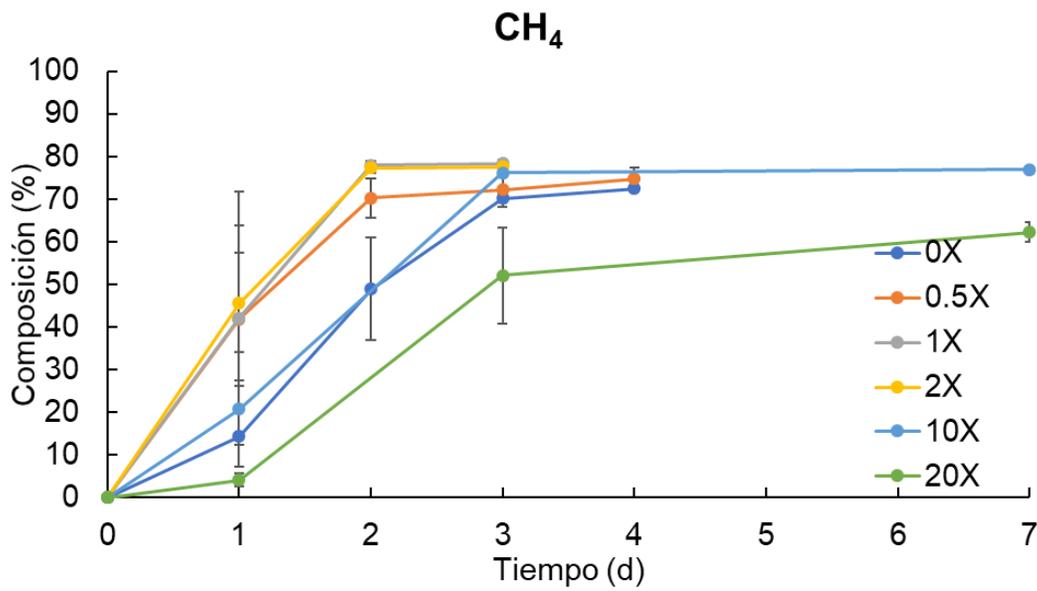


Figura 14. Producción de CH₄ en el estudio del efecto de la concentración de cofactores en el proceso hidrogenotrófico.

En la Figura 14 se puede apreciar la producción de CH_4 , en donde se observa que los experimentos de 1X y 2X se obtiene la máxima producción de CH_4 , con respecto al resto de los experimentos, siendo de 78.3% y 77.6%, respectivamente. Sin embargo, se observa que no existe diferencia significativa entre los experimentos de 0X, 0.5X y 10X. Mientras que en el caso del experimento de 20X se observó una clara inhibición en la producción de CH_4 , cabe resaltar que la diferencia entre cada uno de estos experimentos fue antes de obtener la producción estable de CH_4 , ya que en el día 1 se observó diferencia significativa entre los experimentos, siendo 0.5X, 1X y 2X los experimentos con mayor producción de CH_4 , 41.8%, 42.1% y 45.5%, respectivamente, hasta obtener estabilidad en el día 3.

En la Figura 15 se presenta la tasa de producción de CH_4 con respecto a la concentración de cofactores añadida en cada experimento. Se puede apreciar que, la máxima tasa de producción corresponde a 1X (círculo gris) sin encontrar diferencia significativa con 2X (círculo amarillo), con $738.10 \pm 8.55 \text{ mL}_{\text{CH}_4} \text{ L}^{-1}_{\text{R}} * \text{d}^{-1}$ y $731.5 \pm 12.55 \text{ mL}_{\text{CH}_4} \text{ L}^{-1}_{\text{R}} * \text{d}^{-1}$, respectivamente. Mientras que con 0X (círculo azul) y 0.5X (círculo naranja) se observa una disminución en la tasa de producción sin encontrar diferencia significativa con 10X (círculo rojo). En el caso de 20X (círculo verde) se observa una clara inhibición en el proceso hidrogenotrófico. Se puede hacer la conclusión preliminar que, la concentración añadida de 1X y 2X, son las concentraciones de cofactores óptimas para la producción de CH_4 vía hidrogenotrófica, no obstante, se requiere de un análisis más a fondo con respecto a los datos obtenidos, por lo que se realizó ajustes de Gompertz para cada uno de los experimentos, ya que este modelo representa adecuadamente los datos obtenidos, posteriormente se realizó análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, para la selección de la concentración óptima de cofactores para el proceso hidrogenotrófico..

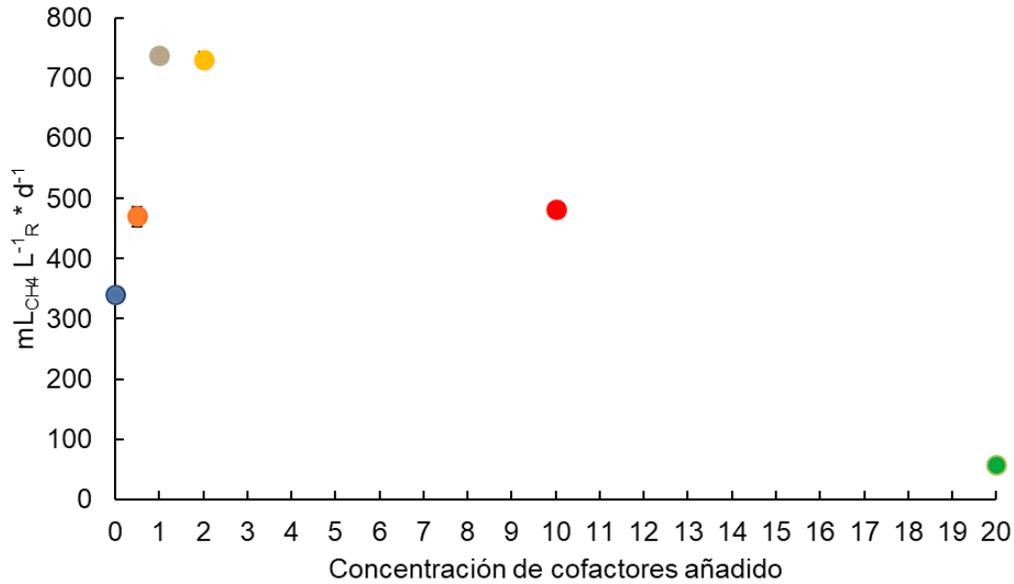


Figura 15. Tasa de producción de CH₄ con respecto a la concentración de cofactores añadido al proceso hidrogenotrófico.

En la Figura 16 se presenta el ajuste del modelo de Gompertz con los datos experimentales obtenidos con todas las concentraciones de cofactores estudiadas. El ajuste de los datos presentó coeficientes de correlación (R^2) entre 96% y 99%, confirmando que el modelo de Gompertz describió de forma adecuada a los datos experimentales y los parámetros cinéticos determinados se consideraron confiables. Los valores de H_{max} , R_{max} y λ para cada concentración de cofactores se presentan en la Tabla 7. Se puede apreciar que, en todas las concentraciones de cofactores se alcanzó una concentración máxima de CH₄ semejante con valores entre $72.4 \pm 0.5\%$ y $78.3 \pm 0.9\%$ en todos los casos (correspondientes con 273.74 ± 1.51 mLCH₄ y 296.99 ± 3.30 mL CH₄). Los valores más bajos de H_{max} se determinaron con MSM 0X y 20X (273.74 ± 1.51 mL y 235.07 ± 8.53 mL, respectivamente) y fueron significativamente diferentes entre MSM 0.5X, 1X, 2X y 10X (Tabla 7). Es importante mencionar que, aun cuando existieron diferencias significativas en H_{max} por la concentración de cofactores, este efecto se observó en el mayor de los casos (67% de los casos), indicando que la concentración máxima de CH₄ producida no se verá modificada en gran medida por la concentración de cofactores, por lo que, H_{max} fue el parámetro menos sensible a cambios

en la concentración de cofactores, ya que en todas las concentraciones añadidas se alcanzó una concentración máxima de producción de CH₄ semejante.

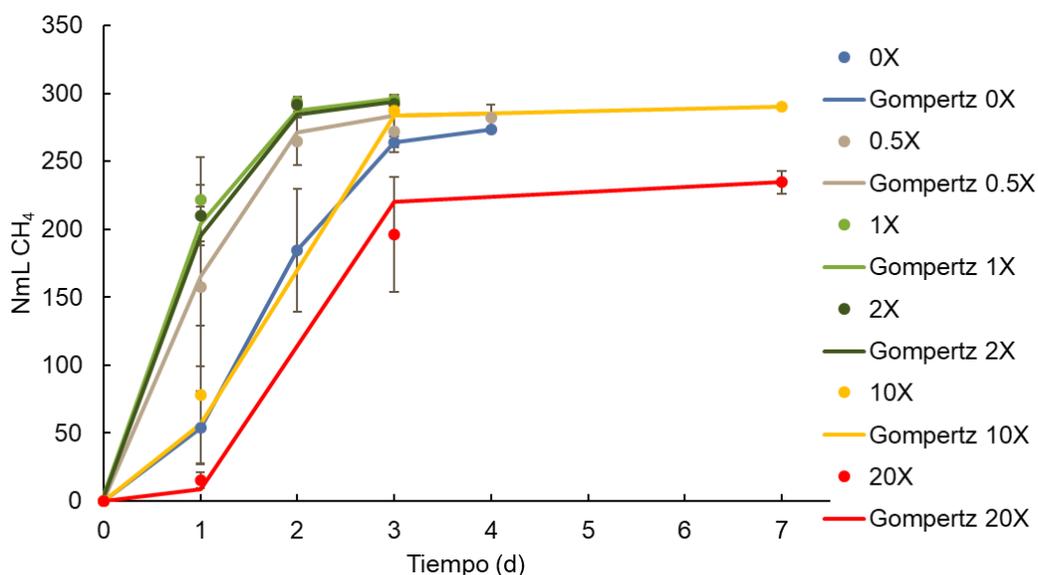


Figura 16. Ajuste del modelo de Gompertz (línea continua) a los datos experimentales (símbolos) de concentración de CH₄ obtenidos con las concentraciones de cofactores estudiadas.

Tabla 7. Valores de los parámetros cinéticos del modelo de Gompertz para las concentraciones de cofactores añadidas. Los resultados de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) se presentan entre paréntesis para cada parámetro determinado. Valores con la misma letra capital en cada parámetro no son significativamente diferentes.

Experimento	H _{max} (mL)	R _{max} (mL d ⁻¹)	λ (d)
MSM 0X	273.74 ± 1.51 (A)	218.78 ± 9.54 (A)	0.83 ± 0.02 (A)
MSM 0.5X	285.28 ± 5.00 (A, B)	247.34 ± 2.09 (B)	0.32 ± 0.00 (B)
MSM 1X	296.99 ± 3.30 (B)	262.57 ± 1.27 (C)	0.18 ± 0.02 (C)
MSM 2X	294.93 ± 5.51 (B)	260.12 ± 2.19 (B, C)	0.21 ± 0.02 (B, C)
MSM 10X	290.41 ± 1.73 (B)	224.38 ± 7.78 (A)	0.76 ± 0.04 (A)
MSM 20X	235.07 ± 8.53 (C)	171.52 ± 3.41 (D)	1.11 ± 0.08 (D)

En el caso de R_{max} , el valor más bajo obtenido se determinó con el MSM 20X ($171.52 \pm 3.41 \text{ mL d}^{-1}$), mientras que el valor más alto se determinó con MSM 1X ($262.57 \pm 1.27 \text{ mL d}^{-1}$). La diferencia entre el valor de R_{max} con MSM 1X y 20X fue del 35%, observándose una clara inhibición del proceso hidrogenotrófico con MSM 20X. También se observó que, no existe diferencia significativa entre MSM 1X y 2X. Mientras que los valores más bajos de R_{max} correspondieron para 0X, 0.5X y 10X. Se observó también que no existe diferencia significativa entre MSM 0X y 10X, así como también entre MSM 0.5X y 2X. Cabe resaltar que no se observó inhibición completa en la adición de MSM 0X debido a que contenía cofactores provenientes del inóculo enriquecido del cultivo semilla.

En el caso de λ , el valor más bajo obtenido se determinó con el MSM 1X ($0.18 \pm 0.02 \text{ d}$) mientras que el valor más alto se determinó con MSM 20X ($1.11 \pm 0.08 \text{ d}$). La diferencia entre el valor de λ con MSM 1X y 20X fue del 16%, observando un retardo en la fase de latencia para la producción de CH_4 en altas concentraciones de cofactores, por lo que indica una clara inhibición del proceso hidrogenotrófico con MSM 20X. También se observó que, no existe diferencia significativa entre MSM 1X y 2X. Mientras que los valores más bajos de λ correspondieron a MSM 0X, 0.5X y 10X. Se observó también que no existe diferencia significativa entre MSM 0X y 10X, así como también entre MSM 0.5X y 2X.

La concentración de biomasa presente en el proceso hidrogenotrófico juega un papel fundamental puesto que, se requiere de una relación optima entre las arqueas y cofactores, ya que las arqueas requieren de una óptima concentración de cofactores para desempeñar su función en la producción de CH_4 . La concentración de cofactores presentes en MSM 0X, 0.5X, 1X, 2X, 10X y 20X hace referencia a la concentración de cofactores en el líquido (mg L^{-1}) tal y como lo propone Angelidaki y col. (2009), en la Tabla 8 se presenta la concentración de biomasa obtenida con las concentraciones estudiadas, donde se observa que, no existe diferencia significativa. En la literatura no se ha presentado un consenso de la concentración específica de los cofactores, ya que, es la forma más adecuada para evaluar el efecto de los cofactores en el proceso metanogénico hidrogenotrófico. En el presente trabajo se determinó la concentración específica del Fe, Ni, Zn, Co y Mo, cabe mencionar que, para determinar que concentración de biomasa y de cofactores fue la óptima, se consideró como parámetro de criterio a R_{max} debido a que varió hasta un 35% entre

el valor más alto y bajo. Considerando lo anterior, el R_{max} más alto fue para MSM 1X, sin encontrar diferencia significativa con MSM 2X, por lo tanto, se tomó la concentración de biomasa de MSM 1X y 2X para la obtención de la concentración específica de los cofactores estudiados, por lo que quedo de la siguiente manera: Fe, 0.1042-0.2123 mg/gSSV; Ni 0.0042-0.0086 mg/gSSV; Zn 0.0044-0.0090 mg/gSSV; Co 0.0023-0.0046 mg/gSSV y Mo 0.0050-0.0102 mg/gSSV (Tabla 9).

Tabla 8. Concentración de SSV en cada concentración estudiada.

Experimento	SSV (g L ⁻¹)
MSM 0X	0.50±0.08
MSM 0.5X	0.52±0.02
MSM 1X	0.57±0.17
MSM 2X	0.54±0.08
MSM 10X	0.50±0.05
MSM 20X	0.48±0.02

Tabla 9. Concentración específica de Fe, Ni, Zn, Co y Mo en cada sistema estudiado, MSM 0.5X, MSM 1X, MSM 2X, MSM 10X y MSM 20X.

mg Cofactor/ g SSV					
Cofactor	MSM 0.5X	MSM 1X	MSM 2X	MSM 10X	MSM 20X
Fe	0.054±1.8×10 ⁻³	0.104±3.1 ×10 ⁻²	0.212±3.1 ×10 ⁻²	1.141±1.1 ×10 ⁻¹	2.357±1.2 ×10 ⁻¹
Ni	0.002±7.4 ×10 ⁻⁵	0.001±1.3 ×10 ⁻³	0.009±1.3 ×10 ⁻³	0.046±4.6 ×10 ⁻³	0.095±4.9 ×10 ⁻³
Zn	0.002±7.7 ×10 ⁻⁵	0.004±1.3 ×10 ⁻³	0.009±1.31 ×10 ⁻³	0.049±4.9 ×10 ⁻³	0.100±5.2 ×10 ⁻³
Co	0.001±4.0 ×10 ⁻⁵	0.002±6.9 ×10 ⁻⁴	0.005±6.8 ×10 ⁻⁴	0.025±2.5 ×10 ⁻³	0.052±2.7 ×10 ⁻³
Mo	0.003±8.8 ×10 ⁻⁵	0.005±1.5 ×10 ⁻³	0.010±1.49 ×10 ⁻³	0.055±5.5 ×10 ⁻³	0.114± 5.9 ×10 ⁻³

En la literatura se han reportado diversas concentraciones volumétricas de cofactores para la producción de CH₄ vía hidrogenotrófica, tal y como se aprecia en la Tabla 10. Se aprecia que, en el trabajo reportado por Rauchbauer y col. (2016) realizaron la producción de CH₄ vía hidrogenotrófica en un biofiltro percolador con la concentración de cofactores que se muestran en la Tabla 10, con una tasa de producción 54 veces mayor al presente trabajo, a pesar de, no se reporta la concentración específica de los cofactores. Así como también Dupnock y Deshusses (2017) realizaron el estudio en lote y con concentraciones volumétricas de los cofactores presentados en la Tabla 10, con lo que obtuvieron una tasa de producción 2.5 menor con respecto al presente trabajo. Mientras que, Burhardt y col. (2015) realizaron el trabajo en un biofiltro percolador con una concentración volumétrica presentada en la Tabla 10 obteniendo una tasa de producción 12 veces menor al presente trabajo. Unal y col. (2012) realizaron en lote el estudio de la concentración de cofactores presentados en la Tabla 10, con una concentración de biomasa de 5 g_{SSV} L⁻¹, con lo que se obtuvo la concentración específica presentada en dicha tabla, sin embargo, obtuvieron una tasa de producción de 35 veces menor al presente trabajo. Paulo y col. (2017) realizaron en lote el estudio del efecto del Ni (0.5 mg L⁻¹) y Co (0.004 mg L⁻¹) con una concentración de biomasa de 2 g_{SSV} L⁻¹, a partir de esta información se calculó la concentración específica del Ni y Co, consiguiendo una tasa de producción de 1.8 veces menor al presente trabajo. Mientras que, en el presente trabajo se obtuvo la concentración específica a partir de una concentración de biomasa (0.565 g_{SSV} L⁻¹), con una tasa de producción competitiva con respecto a trabajos reportados en la literatura.

Tabla 10. Comparación de resultados obtenidos en el presente trabajo con la literatura

Cofactores	Condiciones de operación	Concentración volumétrica (mg _{Cof} L ⁻¹)	Concentración específica (mg g _{SSV} ⁻¹)	Tasa de producción de CH ₄ (mL d ⁻¹)	Referencia
Ni Co Fe Zn Mo	37°C pH 7.4-7.7	0.0222 0.2152 0.5618 0.0339 0.0078	-	1456.56	Rachbauer y col. (2016)
Ni Co Fe Zn	35°C pH 8.5 100 rpm	0.0049 0.0502 0.4017 0.0404	-	103	Dupnock y Deshusses (2017)
Ni Co Fe Mo	37°C pH 7.2-7.4	0.0396 0.005 0.216 0.0027	-	21.0	Burkhardt y col. (2015)
Ni Co Fe Zn	37°C pH 7.2 5 g _{SSV} L ⁻¹	0.0059 0.047 0.847 0.033	0.0012 0.0094 0.1694 0.0066	7.4	Unal y col. (2012)
Ni Co	30°C pH 7 100 rpm 2 g _{SSV} L ⁻¹	0.5 0.004	0.2500 0.0020	146.34	Paulo y col. (2017)
Ni Co Fe Zn Mo	37°C pH 7.55-7.76 150rpm 0.565 g_{SSV}L⁻¹	0.0227 0.0123 0.562 0.0239 0.0271	0.0042 0.0023 0.1042 0.0044 0.0050	262.57	MSM 1X

5.3. Efecto de la presencia de CH₄ en el proceso metanogénico hidrogenotrófico

Al concluir que, la concentración de cofactores presente en MSM 1X es la óptima para la producción de metano vía hidrogenotrófica, en la siguiente etapa experimental se tomó esta concentración de cofactores para estudiar el efecto de la presencia de CH₄ en el proceso metanogénico hidrogenotrófico. En la Figura 17a se presenta el consumo de H₂ y CO₂, así como la producción de CH₄ obtenida en el efecto sin la presencia de CH₄ inicial, se aprecia que, el consumo total de H₂ fue en el día 2, mientras que, la concentración de CH₄ fue del 78.5% a los 4 días de operación. En la Figura 17b se presenta el consumo de H₂ y CO₂, así como la producción de CH₄ obtenida en la presencia de CH₄ inicial, se aprecia que, el consumo total de H₂ fue en el día 2 mientras que, se obtuvo una concentración de CH₄ del 80.2% a los 4 días de operación. Cabe resaltar que el CO₂ medido en la fase gaseosa no se consumió por completo bajo ninguna condición estudiada. Esto se atribuyó a que el CO₂ es el gas más soluble del proceso hidrogenotrófico y, consecuentemente, una mayor proporción de este sustrato se disolvió en el líquido. Por lo tanto, el análisis de la cinética de los cultivos se basó en datos de producción de metano.

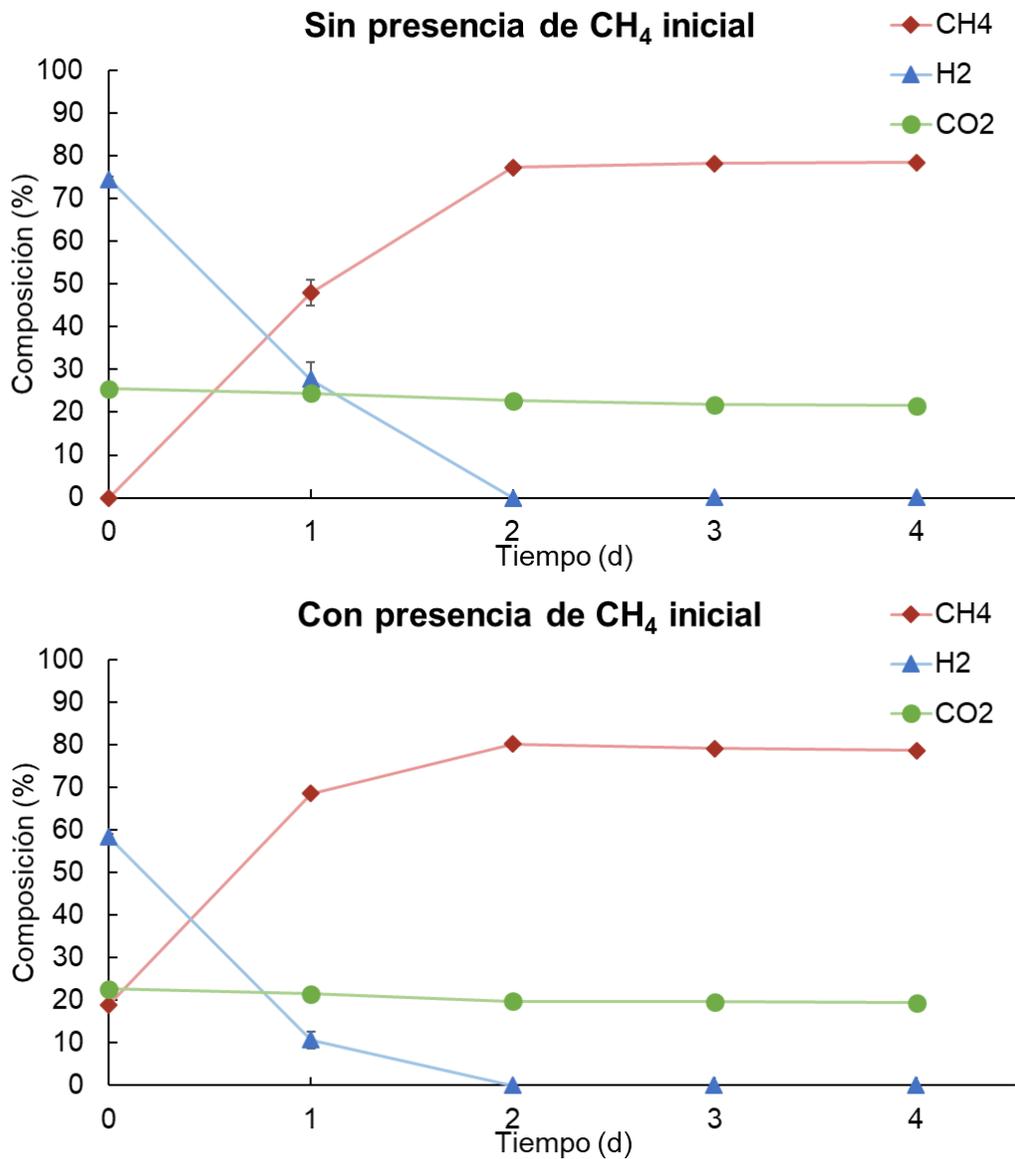


Figura 17. Producción de CH₄ por vía hidrogenotrófica y consumo de H₂ (a) sin presencia de CH₄ inicial y (b) con 20% de CH₄ inicial al inicio del experimento.

En la Figura 18 se presenta el ajuste del modelo de Gompertz a los datos experimentales obtenidos con la presencia de CH₄ inicial y sin la presencia de CH₄ inicial. El ajuste de los datos presentó coeficientes de correlación (R²) del 99%, confirmando que el modelo de Gompertz describió de forma adecuada a los datos experimentales y los parámetros cinéticos determinados que se consideran confiables. Los valores de H_{max}, R_{max} y λ para cada experimento se presentan en la Tabla 11. Se puede apreciar que, en ambos experimentos se obtiene una concentración máxima de CH₄ semejante con valores entre 78.5±0.4% y 78.6±0.6%. Los valores de H_{max} fueron de 296.79±2.08 mL y 296.35±2.89 mL sin y con presencia de CH₄ inicial, respectivamente, con lo que se puede concluir que, no existe diferencia significativa entre ambos experimentos. En el caso de la R_{max} se aprecia diferencia entre ambos experimentos, con valores de 253.30±4.62 mL d⁻¹ y 273.91±2.65 para experimentos sin y con presencia de CH₄ inicial, respectivamente, existiendo una diferencia del 7.32%.

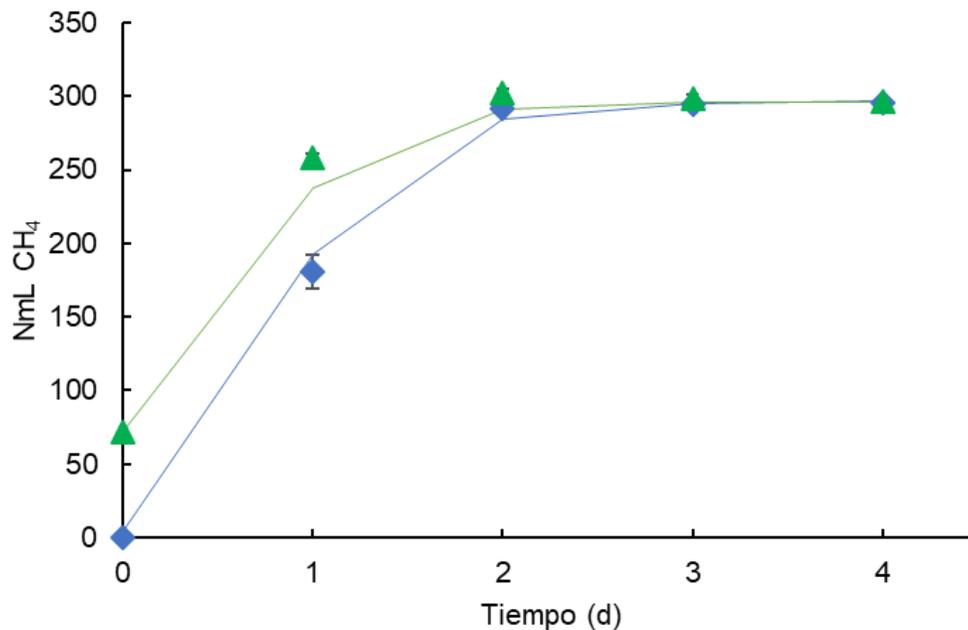


Figura 18. Ajuste del modelo de Gompertz (línea continua) a los datos experimentales de concentración de CH₄ obtenidos de sin CH₄ y con presencia de CH₄ al inicio del experimento.

Tabla 11. Valores de los parámetros cinéticos del modelo de Gompertz para evaluar el efecto de la presencia de CH₄ en el proceso hidrogenotrófico. Los resultados de la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) se presentan entre paréntesis para cada parámetro determinado. Valores con la misma letra capital en cada parámetro no son significativamente diferentes.

Experimento	H _{max} (mL)	R _{max} (mL d ⁻¹)	λ (d)
Sin la presencia de CH ₄ inicial	296.79 ± 2.08	253.30 ± 4.62 (A)	0.21 ± 0.01 (A)
Con la presencia de CH ₄ inicial	296.35 ± 2.89	273.91 ± 2.65 (B)	0.00 ± 0.00 (B)

De acuerdo con lo anterior se concluyó que en H_{max} no existe diferencia significativa con y sin presencia de CH₄ inicial, mientras que con R_{max} si existe diferencia significativa (7.5%) entre ambos experimentos, atribuido a la concentración de CH₄ inicial. Por lo que se concluye que no existe inhibición de producción de CH₄ con la presencia inicial de CH₄. De acuerdo con los resultados presentados se concluye que, no se cumple lo establecido con la ley de acción de masas en el presente trabajo. El análisis de los datos obtenidos concluye que el efecto de la presencia de CH₄ inicial no inhibe la producción de CH₄ vía metanogénesis hidrogenotrófica, por lo tanto, se podría llevar a cabo el enriquecimiento de biogás (~60% CH₄ y ~40% CO₂) por la vía hidrogenotrófica, considerando lo anterior se podría llevar a cabo ensayos en continuo para observar el comportamiento del enriquecimiento de biogás por esta vía.

6. Conclusiones

En el presente trabajo se llevó a cabo el enriquecimiento de arqueas hidrogenotróficas a partir de lodo anaerobio granular a partir de ciclos periódicos de alimentación de H_2 y CO_2 . Se observó la producción estable de CH_4 a partir del día 104 de enriquecimiento con una concentración aproximada del 78%. Las especies de arqueas predominantes en el cultivo semilla fueron *Methanolinea* sp y *Methanobacterium* sp, con abundancias relativas de 67.16% y 28.15%, respectivamente, comprobando la presencia de arqueas metanogénicas hidrogenotróficas previamente reportadas en la literatura.

En el estudio del efecto de la concentración de cofactores se observó que con el MSM 1X se obtuvo la mayor concentración de CH_4 , mientras que con el MSM 20X se observó claramente una inhibición de la producción de CH_4 . La concentración de cofactores no tuvo influencia significativa en H_{max} , mientras que, en el caso de R_{max} se observó una diferencia significativa entre los experimentos, obteniendo los valores más altos con MSM 1X y 2X, 262.57 ± 1.27 mL d^{-1} y 260.12 ± 2.19 mL d^{-1} , respectivamente, siendo MSM 1X y 2X las concentraciones óptimas para la producción de CH_4 por esta vía. Por otro lado, el valor más bajo de R_{max} correspondió a MSM 20X con 171.52 ± 3.41 mL d^{-1} , observando inhibición en el proceso hidrogenotrófico a altas concentraciones de cofactores. En el caso de λ los valores más bajos fueron de MSM 1X y 2X con 0.18 ± 0.02 d y 0.21 ± 0.02 d, respectivamente, mientras que, el valor más alto correspondió a MSM 20X con 1.11 ± 0.08 d. Por lo tanto, se concluye que, la concentración de cofactores óptima para la producción de CH_4 vía hidrogenotrófica correspondió a la presente en MSM 1X, mientras que, a altas concentraciones de cofactores, como la concentración presente en MSM 20X, se inhibe el proceso.

Se demostró que la presencia inicial de CH_4 en el proceso hidrogenotrófico no inhibió el proceso. Por lo tanto, el CO_2 contenido en el biogás es una corriente gaseosa adecuada para llevar a cabo el proceso hidrogenotrófico. No se observó diferencia significativa en H_{max} entre el control sin metano y el experimento con 20% de CH_4 inicial.

7. Bibliografía

- Abas N, Kalair A, Khan N (2015) Review of fossil fuels and future energy technologies. *Futures*, 69:31-49.
- Abdelsalam E, Samer M, Attia Y. A, Abdel-Hadi M.A, Hassan H.E, Badr Y (2017) Effects of Co and Ni nanoparticles on biogas and methane production from anaerobic digestion of slurry. *Energy Conversion and Management*, 141: 108-119.
- Algapani D, Qiao W, Ricci M, Bianchi D, Wandera S, Adani F, Dong R (2019) Bio-hydrogen and bio-methane production from food waste in a two-stage anaerobic digestion process with digestate recirculation. *Renewable Energy*, 130:1108-1115.
- Alitalo A, Niskanen M, Aura E (2015) Biocatalytic methanation of hydrogen and carbon dioxide in a fixed bed bioreactor. *Bioresource Technology*, 196: 600-605.
- Angelidaki I, Alves M, Bolzonella D, Borzacconi L, Campos J. L, Guwy A.J, Kalyuzhnyi S, Jenicek P, vanLier B (2009) Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science & Technology*, 59 (5): 927-934.
- Arellano L, Dorado D, Fortuny M, Gabriel D, Gamisans, Gozáles-Sánchez A, Hernández S, Lafuente J, Monroy O, Mora M, Revah S, Sierra H, (2017) *Purificación y usos del biogás*. Universidad Autónoma de Barcelona, ISBN 978-84-490-6961-1.
- Arreola-Vargas J, Giores-Larios A, González-Álvarez, Corona-González R, Méndez-Acosta H (2016) Single and two-stage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of *Agave tequilana* bagasse. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41;897-904.
- Barragan M, Carrillo J, Buitrón G (2017) Hydrolysis of microalgal biomass using ruminal microorganisms as a pretreatment to increase methane recovery. *Bioresource Technology* 244, 100-107.
- Borja R (2011) *2.55-Biogás Production A2*, 2da edición, Elsevier. ISBN 978-008088504-9.
- Burkhardt M, Busch G, (2013) Methanation of hydrogen and carbon dioxide. *Applied Energy*, 111: 74-79.
- Burkhardt M, Busch G, (2015) Biocatalytic methanation of hydrogen and carbon dioxide in an anaerobic three-phase system. *Bioresource Technology*, 178: 330-333.

- Bassani, I., Kougias, P. G., Treu, L., & Angelidaki, I. (2015). Biogas upgrading via hydrogenotrophic methanogenesis in two-stage continuous stirred tank reactors at mesophilic and thermophilic conditions. *Environmental science & technology*, 49: 12585-12593.
- Carrillo-Reyes J, Buitron G (2016) Biohydrogen and methane production via a two-step process using an acid pretreated native microalgae consortium. *Bioresource Technology*, 221:324-330.
- Choong Y, Norli I, Zuhairi A, Firdaus Y (2016) Impacts of trace element supplementation on the performance of anaerobic digestion process: A critical review. *Bioresource Tecnology*, 209: 369-379.
- Cipriani G, Di Dio V, Genduso F, La Cascia D, Liga R, Miceli R, Ricco G (2014) Perspective on hydrogen energy carrier and its automotive applications. *Hydrogen Energy* 39: 8482-8494.
- Costa K, Leigh J, (2014) Metabolic versatility in methanogens. *Current Opinion in Biotechnology*, 29: 70-75.
- Dareioti M, Kornaros M (2014) Effect of hydraulic retention time (HRT) on the anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes in a two-stage CSTR system. *Bioresource Technology*, 167:407-415.
- Demirel B, SchererP (2011) Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. *Biomass Bioenergy*, 35: 992–998.
- Devlin T (2006) *Bioquímica*. 4ta edición, Reverté, ISBN 84-291-7208-04.
- Díaz I, Pérez C, Alfaro N (2015) A feasibility study on the bioconversion of CO₂ and H₂ to biomethane by gas sparging through polymeric membranes. *Bioresource Technology*, 185: 246-253.
- Dupnock T, Deshusses M (2017) High-Performance Upgrading Using a Biotrickling Filter and Hydrogenotrophic Methanogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183:488-502.
- Enzmann F, Mayer F, Rother M, Holtmann D (2018) Methanogens: biochemical background and biotechnological applications. *AMD Express*, 8:1.
- Estrada J, Dudek A, Muñoz RI, Quijano Go (2013) Fundamental study on gas-liquid mass transfer in a biotrickling filter packed with polyurethane foam. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89:1419-1424.

- Evranos B, Demirel B (2015) The impact of Ni, Co and Mo supplementation on methane yield from anaerobic mono-digestion of maize silage. *Environmental Technology*, 36: 1556-1562.
- Feduchi C, Romero M, Yañez C, García-Hoz J (2015) *Bioquímica: conceptos esenciales*, Médica panamericana, ISBN 978-84-9835-874-2.
- Fu S, Xu X, Dai M, Yuan X, Guo R (2017) Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. *Process Safety and Environmental Protection*, 107;81-86.
- Glass J, Orphan V (2012) Trace metal requirements for microbial enzymes involved in the production and consumption of methane and nitrous oxide. *Microbiological Chemistry and Geomicrobiology*, 3: 1-20.
- Götz M, Lefebvre J, Mörs F, McDaniel K, Graf F, Bajohr S, Reimert R, Kolb T (2015) Renewable Power-to-gas: A technological and economic review. *Renewable Energy*, 85: 1371-1390.
- Gunsalus, R. P., Cook, L. E., Crable, B., Rohlin, L., McDonald, E., Mouttaki, H., ... & Daligault, H. E. (2016). Complete genome sequence of *Methanospirillum hungatei* type strain JF1. *Standards in genomic sciences*, 11; 1-2.
- Herrera E, Ramos M, Roca P, Viana M (2014) *Bioquímica básica*, 1era Edición, Elsevier España, ISBN 978-84-9022-388-8.
- Hosseini Majid (2019) *Advances in feedstock conversion technologies for alternative fuels and bioproducts*. Elsevier, ISBN 978-0-12-817938-3.
- IEA (2013) International Energy Agency. *World Energy Outlook*. ISBN: 978-92-64-20130-9.
- IEA (2016) International Energy Agency. *Next Generation Wind and Solar Power*, Clean Energy Ministerial.
- IEA (2017) International Energy Agency. *Global Energy & CO2 Status Report*. www.iea.org/geco/emissions/
- IEA (2017) International Energy Agency. *World Energy Outlook. Global shifts in the energy system*. www.iea.org/weo2017
- IEA (2018) International Energy Agency. *Oil Market Report*. www.iea.org/oilmarketreport/omrpublic/
- Imachi H, Sakai S, Sekiguchi Y, Hanada S, Kamagata Y, Ohashi A, Harada H (2008) *Methanolinea tarda* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from methanogenic

- digester sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58; 294-301.
- IPCC (2012) Intergovernmental Panel on Climate Change Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation-Special Report of the Intergovernmental Panel on climate Change. ISBN 978-92-9169-131-1.
- IPCC (2014) Intergovernmental Panel on Climate Change IPCC Climate Change 2014-Synthesis Report. ISBN 978-92-9169-142-5.
- Jankowska E, Sahu A, Oleskowics-Popiel P (2017) Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 75: 692-709.
- Jansen S (2004) Speciation and bioavailability of cobalt and nickel in anaerobic wastewater treatment, ISBN 90-8504-114-7.
- Ju D, Shin J, Lee H, Kong S, Kim J, Sang B (2008) Effects of pH conditions on the biological conversion of carbon dioxide to methane in a hollow-fiber membrane biofilm reactor (Hf-MBfR). *Desalination*, 234: 409-415.
- Kadam R, Panwar N (2017) Recent advancement in biogas enrichment and its applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 73: 892-903.
- Lambie, S. C., Kelly, W. J., Leahy, S. C., Li, D., Reilly, K., McAllister, T. A., ... & Altermann, E. (2015). The complete genome sequence of the rumen methanogen *Methanosarcina barkeri* CM1. *Standards in genomic sciences*, 1: 10,57.
- Lebrero R, Estrada J, Muñoz R, Quijano G (2014) Deterioration of organic packing materials commonly used in air biofiltration: Effect of VOC-packing interactions. *Journal of Environmental Management*, 137: 93-100.
- Lee J, Kim J, Chang W, Pak D (2012) Biological conversion of CO₂ to CH₄ using hydrogenotrophic methanogen in a fixed bed reactor, *Chemical Technology & Biotechnology*, 87:844-847.
- Lehninger N, Cox M (2008) *Principios de bioquímica*, 4arta edición, PRENTICE HALL/PEARSON, ISBN 9702610257.
- Liu Y, Whitman W (2008) Metabolic, Phylogenetic, and Ecological diversity of the Methanogenic Archea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125:171-189.

- Luo, G., Angelidaki, I. (2012). Integrated biogas upgrading and hydrogen utilization in an anaerobic reactor containing enriched hydrogenotrophic methanogenic culture. *Biotechnology and bioengineering*, 109(11), 2729-2736.
- Lyu Z, Shao N, Akinyemi T, Whitman W (2018) Methanogenesis. *Current Biology*, 28: R727 -R732.
- McMichael A (2013) Globalization, Climate Change and Human Health. *The New England Journal of Medicine*, 368: 1335-1343.
- Meier L, Pérez R, Azócar L, Rivas M, Jeison D (2015) Photosynthetic CO₂ uptake by microalgae: An attractive tool for biogas upgrading. *Science Direct*: 73: 102-109.
- Minh T, Ketheesan B, Yan Z, Stuke D (2016) Trace metal speciation and bioavailability in anaerobic digestion: A review. *Biotechnology Advances*, 34:122-136.
- Ojeda F, Bakonyi P, Buitrón G (2017) Improvement of methane content in a hydrogenotrophic anaerobic digester via the proper operation of membrane module integrated into an external-loop. *Bioresource Technology*, 245: 1294-1298.
- ONU, Organización de las Naciones Unidas, 2018, Población. www.un.org/es/sections/issues-depth/population/index.html
- Perel'man A (2012) *Geochemistry of Epigenesis*, septima edición, Springer, ISBN: [978-1-4684-7520-3](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7520-3).
- Park M, Jo J, Park D, Lee D, Park J (2010) Comprehensive study on a two-stage anaerobic digestion process for the sequential production of hydrogen and methane from cost-effective molasses. *Hydrogen Energy*, 35:6194-6202.
- Passio, L., Rizzo, L., and Fuchs, S. (2012). Two-phase anaerobic digestion of partially acidified sewage sludge: a pilot plant study for safe sludge disposal in developing countries. *Environmental Technology*, 33; 2089-2095.
- Paulo L, Ramiro-Garcia J, van Mourik S, Stams A, Sousa D (2017) Effect of nickel and cobalt on methanogenic enrichment cultures and role of biogenic sulfide in metal toxicity attenuation. *Front. Microbiol*, 8:1341.
- Pavlostathis S, Giraldo-Gómez E (1991) Kinetics of anaerobic treatment: A critical review. *Critical reviews in Environmental Control*, 21:411-490.
- Primo Y (2007) *Química orgánica básica y aplicada*, 2da edición. Reverté, ISBN: 978-84-291-7954-5.

- Qiang, H., Lang, D. L., & Li, Y. Y. (2012). High-solid mesophilic methane fermentation of food waste with an emphasis on iron, cobalt, and nickel requirements. *Bioresource technology*, 103(1), 21-27.
- Rachbauer L, Voitl G, Bochmann G, Fuchs W (2016) Biological biogas upgrading capacity of a hydrogenotrophic community in a trickle-bed reactor, 180:483-490.
- Rahman K (2007) Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *National Center for Biotechnology Information*, 2:219-236.
- Rittmann S, Seifert A, Herwing C (2013) Essential prerequisites for successful bioprocess development of biological CH₄ production from CO₂ and H₂. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(2): 141-151.
- Rodríguez-Pimentel, R. I., Rodríguez-Pérez, S., Monroy-Hermosillo, O., Ramírez-Vives, F. (2015). Effect of organic loading rate on the performance of two-stage anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *Water Science and Technology*, 72; 384-390.
- Romero-Güiza M, Vila J, Mata-Alvarez J, Chimenos J, Astals S (2016) The role of additives on anaerobic digestion: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58:1486-1499.
- Sander R (1999) *Compilation of Henry's law constants for inorganic and Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry*.
- Schievano A, Tenca A, Scaglia B, Merlino G, Rizzi A, Daffonchio D, Oberti R, Adani F (2012) Two-stage vs single-stage thermophilic anaerobic digestion: comparison of energy production and biodegradation efficiencies. *Environmental Science & Technology*, 46; 8502-8510.
- Secretaría de Energía-Sistema de Información Energética, 2018, Dirección General de Planeación e Información Energéticas, producción de gas natural.
- SENER, 2017. Secretaría de Energía, *Prospectivas de Energías Renovables*, SEGOB. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/177622/Prospectiva_de_Energias_Renovables_20162030.pdf
- Shinya H (2015) *La enzima prodigiosa*. Punto de lectura, ISBN 9788466323543.
- Solera del Rio R, Álvarez C, Aymerich E, Bedmar E, Carballa M, Castrillón L, Flotats X, López M, Marañón E, Prenafeta F, Tortosa G, Vicent T (2014) *De Residuo a Recurso-Aspectos biológicos de la Digestión Anaeróbica*, Grupo Mundi-Prensa.

- Spliethoff H (2010) *Power Generation from Solid Fuels*, Springer., ISBN 978-3-642-02855-7.
- Sun Q, Li H, Yan J, Liu L, Yu Z, Yu X (2015) Selection of appropriate biogas upgrading technology- a review of biogas cleaning, upgrading and utilization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51:521-532.
- Thauer R, Kaster A, Goenrich M, Schick M, Hiromoto T, Shima S (2010) Hydrogenases from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H₂ storage. *Annual Review of Biochememestry*, 79: 507–536.
- Tortora G, Funke B, Case C (2007) *Introducción a la Microbiología*. 9ena edición, Médica panamericana, ISBN 978-950-06-0740-7.
- Tuo, Y., Cai, J., Zhu, D., Zhu, Y., Liu, G., Hua, Y., & He, J. (2014). Effect of Zn²⁺ on the performances and methanogenic community shifts of UASB reactor during the treatment of swine wastewater. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(6), 1996.
- Unal, B., Perry, V. R., Sheth, M., Gomez-Alvarez, V., Chin, K. J., & Nüsslein, K. (2012). Trace elements affect methanogenic activity and diversity in enrichments from subsurface coal bed produced water. *Frontiers in microbiology*, 3, 175.
- Varnero M (2011) *Manual del Biogás*. FAO-ONU. ISBN 978-95-306892-0
- Wang M, Zhao Z, Niu J, Zhang Y (2019) Potential of Crystalline and Amorphous Ferric Oxides for Biostimulation of Anaerobic Digestion. *ACS Sustainable Chemistry & Engeneering*, 7: 697-708.
- Weiland P (2010) Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology Biotechnology*, 85: 849-860.
- Xu R, Zhang K, Liu P, Khan A, Xiong J, Tian F, Li X (2018) A critical review on the interaction of substrate nutrient balance and microbial community structure and function in anaerobic co-digestion. *Biresource Technology*, 247: 1119-1127.
- Yu, D., Li, C., Wang, L., Zhang, J., Liu, J., & Wei, Y. (2016). Multiple effects of trace elements on methanogenesis in a two-phase anaerobic membrane bioreactor treating starch wastewater. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(15), 6631-6642.
- Zabraska J, Pokorna D (2018) Bioconversion of carbon dioxide to methane using hydrogen and hydrogenotrophic methanogens. *Biotechnology Advances*, 36: 707-720.

- Zhang W, Zhang I, Li A (2015) Enhanced anaerobic digestion of food waste by trace metal elements supplementation and reduced metals dosage by green chelating agent [S, S]-EDDS via improving metals bioavailability. *Water Research*, 84: 266-277.
- Zhang, W., Zhang, L., & Li, A. (2015). Enhanced anaerobic digestion of food waste by trace metal elements supplementation and reduced metals dosage by green chelating agent [S, S]-EDDS via improving metals bioavailability. *Water research*, 84, 266-277.
- Zuo Z, Wu S, Zhang W, Dong R (2014) Performance of two-stage vegetable waste anaerobic digestion depending on varying recirculation rates. *Bioresource Technology*, 160:266-272.