



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL (RESIDUOS SÓLIDOS)

**“PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO EN SISTEMAS EN LOTE A PARTIR DE
LA CO-DIGESTIÓN DE DISTINTOS RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTA:

DANIELA VANESSA VILLALOBOS VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. IVÁN MORENO ANDRADE, INSTITUTO DE INGENIERÍA

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO DE 2025



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL (RESIDUOS SÓLIDOS)

**“PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO EN SISTEMAS EN LOTE A PARTIR DE
LA CO-DIGESTIÓN DE DISTINTOS RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTA:

DANIELA VANESSA VILLALOBOS VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. IVÁN MORENO ANDRADE, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR

DR. ALFONSO DURÁ MORENO, FACULTAD DE QUÍMICA -UNAM
M.C. CONSTANTINO GUTIÉRREZ PALACIOS, FACULTAD DE INGENIERÍA-
UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO DE 2025

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Alfonso Durán Moreno
Secretario: Dra. Karla María Muñoz Páez
Vocal 1: Dr. Pabel Antonio Cervantes Avilés
Vocal 2: M.C. Constantino Gutiérrez Palacios
Vocal 3: Dr. Iván Moreno Andrade

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas de la Unidad Académica Juriquilla, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México.

TUTOR DE TESIS

Dr. Iván Moreno Andrade



FIRMA

Apoyos Recibidos y Agradecimientos Institucionales

Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas de la Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México.



**INSTITUTO
DE INGENIERÍA
UNAM**

LIPATA

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN
EN PROCESOS AVANZADOS DE
TRATAMIENTO DE AGUAS

Se agradece al financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la DGAPA-UNAM por medio del proyecto PAPIIT IN102722, para realización de este proyecto de investigación.

Esta tesis está enmarcada dentro de los Grupos Interdisciplinarios de Investigación (GII) del Instituto de Ingeniería de la UNAM, agradeciendo el apoyo del proyecto “Cambio de paradigma: residuos como materia prima para conciliar el eje agua-energía-ambiente-seguridad alimentaria” del Eje temático Agua-Energía-Medio Ambiente-Seguridad Alimentaria.

Se agradece el apoyo técnico del M. en B. Jaime Pérez Trevilla y de la M. en C. Gloria Moreno Rodríguez, por el apoyo durante la parte experimental de este proyecto.

Finalmente, se agradece el apoyo del CONAHCYT mediante la beca otorgada para realizar los estudios de maestría y al Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitir la realización de la maestría en Ingeniería Ambiental.

PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD

ACADÉMICA Y PROFESIONAL

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción 1, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado “**Producción de biohidrógeno en sistemas en lote a partir de la co-digestión de distintos residuos sólidos orgánicos**” que presenté para obtener el grado de maestría en ingeniería Ambiental es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente



Daniela Vanessa Villalobos Vázquez

DEDICATORIA

A mi bebé que viene en camino, por ser mi nueva motivación para ser mejor cada día.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dios, por permitirme concluir el grado de maestría.

A mi familia; a mis padres el apoyo incondicional que me han dado a lo largo de la vida, y a mi hermano, por estar al pendiente de mis papás.

A mi esposo Euler, por el apoyo y motivación para seguir preparándome profesionalmente.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Ingeniería, por haberme recibido como estudiante y proporcionarme lo necesario para realizar mi posgrado.

A la Ing. Cristina, por haber resuelto mis dudas amablemente y por el apoyo brindado en trámites académicos.

A los investigadores de la Unidad Académica Juriquilla, por transmitir sus valiosos conocimientos en clases y también por el tiempo compartido cuando se solicitaba asesoría en sus horarios laborales.

A mi director de tesis, el Dr. Iván Moreno Andrade, por haberme aceptado en su grupo de investigación, por su asesoría y consejos para el desarrollo de mi proyecto.

A mi amiga Monserrat, por haber sido mi mentora, por su asesoría y tiempo dedicado en las actividades de laboratorio, así como el análisis de este trabajo.

Al Dr. Alfonso, M.C. Constantino, Dra. Karla y el Dr. Pabel, por sus valiosos comentarios para mejorar el contenido de la tesis.

A la Dra. Marisol, por el tiempo que me brindó en asesorías.

A toda la comunidad de LIPATA, por haber hecho mi estancia más divertida e inolvidable.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen.....	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1 Situación de los residuos sólidos en México.....	14
2.2 Residuos de alimentos.....	16
2.2.1 Residuos de nopal.....	17
2.2.2 Agua residual de nixtamalización	17
2.3 Digestión anaerobia.....	18
2.4 Características de los residuos sólidos orgánicos para la producción de hidrógeno	18
2.5 Fermentación oscura	19
2.6 Microorganismos presentes en la fermentación oscura.....	20
2.7 Co-digestión de residuos orgánicos.....	20
2.8 Parámetros fisicoquímicos que afectan la fermentación oscura.....	21
2.8.1 pH.....	21
2.8.2 Tamaño de partícula	22
2.8.3 Nutrientes	22
2.8.4 Composición de sustrato	23
2.8.5 Ácidos grasos volátiles.....	24
2.9 Parámetros operacionales que afectan la fermentación oscura	25
2.10 Codigestion para la producción de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos.....	27
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. HIPÓTESIS.....	32
5. OBJETIVOS	32
5.1Objetivo general	32
5.2Objetivos particulares	32
6. ALCANCES.....	32
7. METODOLOGÍA	33
7.1 Etapa 1. Determinación de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas.....	34
7.1.1 Obtención, pretratamiento y caracterización de los sustratos	34
7.1.2 Preparación y caracterización del inóculo.....	34
7.2 Etapa 2. Potencial de producción de hidrógeno	35

7.2.1 Pruebas de co-digestión en lote	36
7.2.2 Parámetros cinéticos.....	36
7.3 Etapa 3. Operación de reactor SBR.....	37
7.4 Análisis de la comunidad microbiana	37
8. RESULTADOS.....	39
8.1 Caracterización del inóculo	39
8.2 Caracterización de los sustratos	39
8.3 Pruebas de co-digestión en lote	41
8.3.1 Concentración de 10 gSV/L	41
8.3.1.1 Ajuste al modelo de Gompertz.....	43
8.3.2 Concentración de 21.7 gSV/L	45
8.3.2.1 Ajuste al modelo de Gompertz.....	47
8.4 Operación de reactor SBR.....	50
8.4.1 Arranque de reactor alimentado con Residuos de <i>Opuntia</i>	50
8.4.2 Arranque de reactor alimentado con Residuos de <i>Opuntia</i> /Residuos de Cafetería.....	51
8.4.3 Análisis de la comunidad microbiana	53
9. CONCLUSIONES	56
10.RECOMENDACIONES	56
11.BIBLIOGRAFÍA	57
12.ANEXOS	62
12.1 Métodos analíticos.....	62
12.2 Curvas de Calibración	63
12.2.1 Curva de calibración de Carbohidratos	63
12.2.2 Curva de calibración de Proteínas	64
12.2.3 Curva de calibración de Lípidos.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición promedio de los RSU.....	14
Figura 2. Pasos para la fermentación oscura y vías microbiológicas.....	19
Figura 3. Esquema metodológico.....	33
Figura 4. Residuos de <i>Opuntia</i>	34
Figura 5. Nejayote.....	34
Figura 6. Residuos sólidos orgánicos de cafetería.....	34
Figura 7. Reactor SBR para la producción de hidrógeno.....	37
Figura 8. Inóculo seco.....	39
Figura 9. Volumen acumulado de H ₂ producido a 10 gSV/L en pruebas en lote.....	42
Figura 10. Principales metabolitos producidos a 10 gSV/L en pruebas en lote.....	43
Figura 11. Cinética de la producción de H ₂ a 10 gSV/L en pruebas en lote.....	44
Figura 12. Volumen acumulado de H ₂ producido a 21.7 gSV/L en pruebas en lote.....	46
Figura 13. Principales metabolitos producidos a 21.7 gSV/L en pruebas en lote.....	47
Figura 14. Cinética de la producción de H ₂ a 21.7 gSV/L en pruebas en lote.....	48
Figura 15. Productividad de H ₂ durante la operación del reactor SBR alimentado con residuos de <i>Opuntia</i>	50
Figura 16. Principales metabolitos producidos durante la operación del reactor SBR alimentado con residuos de <i>Opuntia</i>	51
Figura 17. Productividad de H ₂ durante la operación del reactor SBR alimentado en co-digestión.....	52
Figura 18. Principales metabolitos producidos durante la operación del reactor SBR alimentado en co-digestión.....	53
Figura 19. Clasificación taxonómica a nivel de género de microorganismos presentes en el arranque, ciclo 6 y ciclo 14 de la operación del reactor alimentado con residuos de <i>Opuntia</i>	54
Figura 20. Clasificación taxonómica a nivel de género de microorganismos presentes en el arranque, ciclo 6 y ciclo 15 de la operación del reactor alimentado con residuos de <i>Opuntia</i> /residuos de cafetería.....	55
Figura 21. Curva de calibración de carbohidratos.....	63
Figura 22. Curva de calibración de proteínas.....	64
Figura 23. Curva de calibración de lípidos.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición promedio de los RSU.....	15
Tabla 2. Reacciones típicas de degradación de glucosa en la FO	25
Tabla 3. Producción de hidrógeno a partir de diferentes tipos de sustratos	29
Tabla 4. Diseño experimental.....	35
Tabla 5. Caracterización del inóculo.....	39
Tabla 6. Caracterización fisicoquímica de los sustratos.....	40
Tabla 7. Resultados de pruebas en lote a 10 gSV/L.....	41
Tabla 8. Parámetros del modelo de Gompertz a 10 gSV/L.....	45
Tabla 9. Resultados de pruebas en lote a 21.7 gSV/L.....	46
Tabla 10. Parámetros del modelo de Gompertz a 21.7 gSV/L.....	49
Tabla 11. Métodos analíticos	62

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y SIGLAS

AGRs	Genes de resistencia a antibióticos
AGV	Ácidos grasos volátiles
ARB	Bacterias de resistencia a antibióticos
ATP	Trifosfato de adenosina
BAMX	Banco de alimentos de México
BioH ₂	Bio-hidrógeno
CaCO ₃	Carbonato de calcio
CaOH	Hidróxido de calcio
CIT	Carbón inorgánico total
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
COT	Carbón orgánico total
C/N	Relación carbono-nitrógeno
DA	Digestión anaerobia
DBO ₅	Demanda bioquímica de oxígeno
DQO	Demanda química de oxígeno
FO	Fermentación oscura
GEI	Gases de efecto invernadero
HCl	Ácido clorhídrico
H ₂	Hidrógeno
H ₂ S	Ácido sulfhídrico
N	Nejayote
NADH ₂	Nicotinamida adenina dinucleótido
NaOH	Hidróxido de sodio
NH ₃	Amoniaco
RC	Residuos de cafetería
RO	Residuos de <i>Opuntia</i>
RSU	Residuos sólidos urbanos
SBR	Reactor discontinuo secuencial
SF	Sólidos fijos
ST	Sólidos totales
SV	Sólidos volátiles

Resumen

Los residuos de alimentos, así como las aguas residuales de nixtamalización (nejayote) son residuos potenciales para la producción de hidrógeno mediante la fermentación oscura (Vázquez-López & Moreno-Andrade, 2024), sin embargo, hasta la fecha no se tiene suficiente información acerca de la producción de hidrógeno utilizando nopal (*Opuntia* spp). Por lo que el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la producción de hidrógeno en sistemas en lote mediante la co-digestión de nejayote (N), residuos sólidos orgánicos de cafetería (RC) y residuos de *Opuntia* (RO). Para ello, un diseño simple centroide fue propuesto para encontrar la mezcla con la más alta producción de hidrógeno. Las proporciones evaluadas fueron 100/0/0, 0/100/0, 0/0/100, 50/50/0, 50/0/50, 0/50/50, 33/33/33/, 66/16/16, 16/66/16, y 16/16/66 (N/ RC/ RO), respectivamente. Las pruebas de co-digestión en lote para evaluar la producción de hidrógeno se realizaron en un Sistema Automático de Prueba del Potencial de Metano (AMPTS-II), en el cual las mezclas primero se analizaron a una concentración inicial de 10 gSV/L y posteriormente a una concentración inicial de 21.7 gSV/L. Ambos ensayos se realizaron a una temperatura de operación de 37°C y con ajuste de pH inicial de 7.5. Los resultados indicaron que la máxima producción de hidrógeno se obtuvo con la proporción 0/50/50 a 10 gSV/L (47.4 NmLH₂), siendo el ácido acético el principal metabolito obtenido. Posteriormente, se evaluó la producción de hidrógeno de esta mezcla en un reactor discontinuo secuencial (SBR) en condiciones anaerobias, a una temperatura de 37°C y ajustando el pH inicial a 7.5 (sin reajuste subsiguiente). Se alcanzó una productividad de 393 mLH₂/L-d, teniendo como principales metabolitos el ácido propiónico y el ácido acético. Los cambios en la estructura de la comunidad microbiana presentes en el arranque, ciclo final 6 y ciclo final 15 de la operación del reactor se analizaron mediante una secuenciación utilizando la plataforma MiSeq. Los resultados mostraron que la comunidad productora de hidrógeno más abundante fue *Escherichia*. En conclusión, la co-digestión de RC y RO puede ser factible en la producción de hidrógeno mediante la fermentación oscura, ya que no se detectó la presencia de ácido láctico ni se presentó una acidificación en el sistema por acumulación de AGV, los cuales son algunos de los principales problemas al utilizar residuos alimentarios en mono-digestión.

1. INTRODUCCIÓN

Las reservas de combustibles fósiles han disminuido drásticamente en las últimas dos décadas (Ahmad et al., 2024). El gas natural, el carbón y el petróleo representan cerca del 85% de la energía mundial producida y consumida, lo que ha contribuido tanto a crisis energéticas como a desafíos ambientales. Para satisfacer las demandas mundiales de energía se emiten a la atmósfera alrededor de 36 mil millones de toneladas de CO₂ anualmente. Siendo más del 90% de estas emisiones emitidas por combustibles fósiles (Agyekum & Odoi-Yorke, 2024). Por lo que, encontrar fuentes de energía renovables para reducir las emisiones de CO₂ es un objetivo crítico (Ahmad et al., 2024).

Desde esta perspectiva, el hidrógeno como alternativa para la transición de una fuente no renovable a energía limpia es prometedora. Es un combustible limpio, libre de carbono ya que solo produce agua como subproducto y posee una alta densidad energética (de 120 a 142 MJ/kg), siendo hasta 2.5 veces más alto que el metano o el gas natural y hasta 5.9 veces más que la gasolina (Rosa-e Silva et al., 2024).

Se puede obtener bioH₂ sin emisiones de carbono mediante la fermentación oscura de sustratos orgánicos, el cual es un proceso simple, no dependiente de luz, de bajo costo, altos rendimientos y bajo impacto ambiental (Tarazona et al., 2022). Se puede producir a partir de sustratos complejos que contienen un alto contenido de materia orgánica tal como residuos sólidos municipales, residuos agrícolas, residuos de comida y aguas residuales (García-Depraet et al., 2017), de esta manera obtener valiosos metabolitos con valor en el mercado. Dentro de los principales criterios para seleccionar un sustrato están el que no se utilice para otros fines económicos, disponibilidad, tener un nulo o bajo costo, alto potencial de biogás para la fermentación o co-digestión con otro sustrato (Harder et al., 2020).

Para aumentar la biodegradabilidad y producción de biogás, la co-digestión se puede llevar a cabo con diferentes tipos de residuos debido a los efectos sinérgicos y complementarios al mezclar los sustratos (Berrocal-Bravo, 2017). Este proceso ofrece seguridad y digestatos de mejor calidad para aplicaciones en la agricultura, reducción de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) y bacterias de resistencia a antibióticos (ARB) (Karki et al., 2021), mejor disponibilidad y balance de macronutrientes y micronutrientes para un buen crecimiento microbiano, balance de humedad, mejor capacidad amortiguadora, dilución de componentes inhibitorios y estabilidad en el proceso (Tyagi et al., 2018).

En este sentido, en el presente trabajo se evaluó la producción de hidrógeno mediante la co-digestión de aguas residuales de nixtamalización (nejayote), residuos de comida (residuos sólidos orgánicos de cafetería) y residuos de nopal (*Opuntia* spp.) con el fin de incrementar la producción. Para ello, primero se identificó el efecto de la co-digestión de los sustratos en sistemas fermentativos en lote para determinar la proporción (v:v) con la que se obtiene la mayor producción de hidrógeno. Posteriormente, se evaluó la producción de hidrógeno de esta proporción, pero ahora en un reactor SBR con el fin de estudiar el comportamiento de la mezcla a largo plazo. Por último, se identificaron los cambios de la comunidad microbiana presente en diferentes ciclos de operación del reactor.

2. ANTECEDENTES

2.1 Situación de los residuos sólidos en México

Los RSU son aquellos que se producen en los domicilios, oficinas o pequeños comercios, así como los que provienen de cualquier otra actividad con características domiciliarias (SEMARNAT, 2016). La predominancia de residuos orgánicos o inorgánicos se asocia a la condición económica de la población: en los países con menores ingresos dominan los de composición orgánica, mientras que en los países con mayores ingresos los residuos son principalmente inorgánicos, con una cantidad importante de productos manufacturados (SEMARNAT, 2019). Los residuos alimentarios y verdes representan el 32% del total de residuos sólidos generados en los países de ingresos altos, mientras que estas fracciones representan el 53 y el 56% en los países de ingresos medios y bajos, respectivamente (Salazar-Batres et al., 2022).

El conocimiento de la composición de los residuos es fundamental para determinar los subproductos o fracciones de los residuos aprovechables, qué residuos pueden ser valorizados y cuáles serían los sistemas más adecuados para ello. Del 46.42% de los residuos orgánicos producidos en nuestro país, el 33.07% lo constituyen los residuos alimentarios (SEMARNAT, 2020) (Figura 1). Los cuales pueden ser aprovechados en la generación de energía.

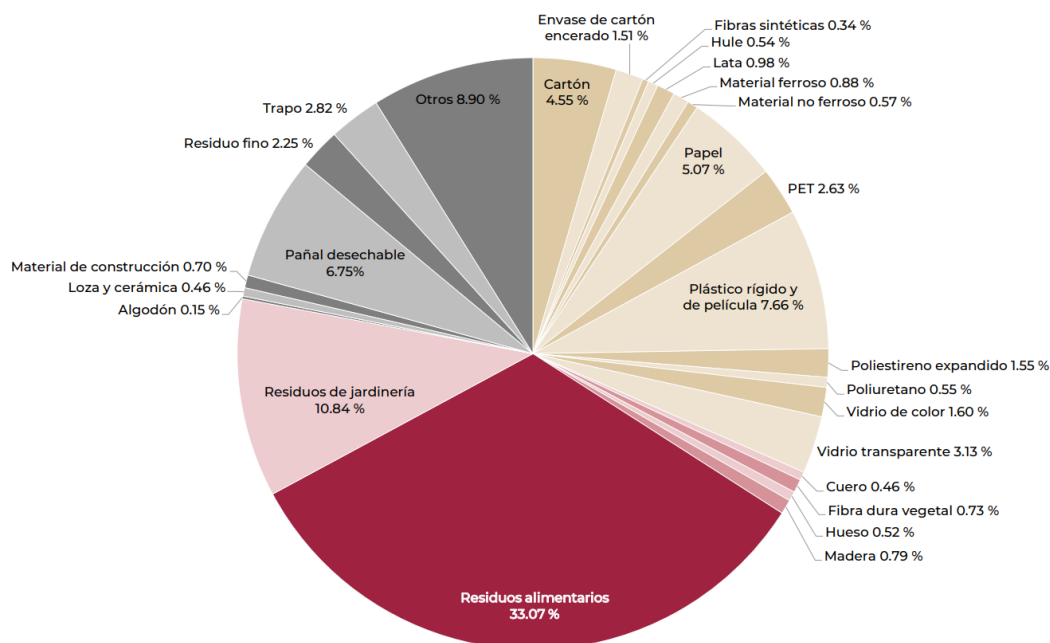


Figura 1. Composición promedio de los RSU.

Fuente: SEMARNAT, 2020.

De los RSU generados en México, la generación per cápita calculada fue de 0.944 kg/hab/día y la generación total de residuos se estima en 120 mil 128 t/día, de los cuales el 31.56% corresponde a residuos susceptibles de aprovechamiento, el 46.42% a residuos orgánicos y el 22.03% a otros residuos (SEMARNAT, 2020) (Tabla 1).

Tabla 1. Composición promedio de los RSU.

Categoría	Subproductos	Porcentaje
Susceptibles de aprovechamiento: 31.56%	Cartón	4.55
	Envase de cartón encerado	1.51
	Fibras sintéticas	0.34
	Hule	0.54
	Lata	0.98
	Material ferroso	0.88
	Material no ferroso	0.57
	Papel	5.07
	PET	2.63
	Plástico rígido y de película	7.66
	Poliestireno expandido	1.55
	Poliuretano	0.55
	Vidrio de color	1.60
	Vidrio transparente	3.13
Orgánicos: 46.42%	Cuero	0.46
	Fibra dura vegetal	0.73
	Hueso	0.52
	Madera	0.79
	Residuos alimentarios	33.07
	Residuos de jardinería	10.84
Otros: 22.03%	Algodón	0.15
	Loza y cerámica	0.46
	Material de construcción	0.70
	Pañal desechable	6.75
	Residuo fino	2.25
	Trapo	2.82
	Otros	8.90
Total		100

Fuente: SEMARNAT, 2020.

Desde el punto de vista ambiental y de salud pública, el manejo adecuado de los residuos en las etapas que siguen a su generación permite mitigar sus impactos negativos sobre el ambiente y la salud (SEMARNAT, 2019). En México existen 47 plantas de tratamiento de residuos donde se realizan los siguientes procesos: en 26 separación o reciclaje, en 5 trituración, en 13 compactación, en 19 compostaje y en 5 biodigestión (SEMARNAT, 2020).

2.2 Residuos de alimentos

La composición de los residuos sólidos municipales varía según sus fuentes, comprende fracciones orgánicas e inorgánicas como residuos de cocina o alimentos, papel, cartón, plásticos, cauchos, vidrio, material inerte como muebles rotos, polvo, residuos de concreto, residuos de jardín y otros residuos inorgánicos. La mayoría de los residuos sólidos municipales provienen de actividades domésticas (55-80%), seguido de mercados o sectores comerciales (10-30%) (Shah et al., 2022).

Los residuos sólidos orgánicos contienen proteínas, azúcares y minerales que son materia prima valiosa para productos de valor agregado. El desperdicio de alimentos tiene un gran potencial para la bio-conversión de energía debido a su capacidad altamente degradable, por ejemplo, los residuos orgánicos de vegetales y frutas son adecuados para la producción de enzimas vitales y ácidos orgánicos. Los desechos domésticos de alimentos tienen una composición compleja que incluye papel, pan fideos, arroz, verduras y todos estos desechos se componen de grasa, celulosa, proteínas y otros contenidos orgánicos (Duan et al., 2020).

De acuerdo con el Banco de Alimentos de México (BAMX), en México un tercio del alimento producido se desperdicia, lo que equivale a 38 toneladas por minuto y son los hogares los mayores responsables. En 2019 se estimó un desperdicio de alimentos de 931 millones de toneladas, de los cuales el 61% provino de hogares, 26% del servicio de alimentos y 13% restante del comercio minorista como supermercados o pequeños almacenes (PROFECO, 2022).

Los residuos de alimentos incluyen comida sin consumir, sobras de preparación de alimentos de residencias y comercios como restaurantes y cafeterías. Este tipo de residuo presenta un problema ambiental particularmente en las grandes ciudades, donde los vertederos y los rellenos sanitarios son utilizados como el método típico para la disposición final (Harder et al., 2020). Los residuos de alimentos son una mezcla compleja de diferentes desechos, que incluyen frutas, verduras, carne, huevos, cereales, pan, pasta y a veces papel (Moreno-Andrade et al., 2022).

Los residuos de alimentos consistentes en arroz, pasta y vegetales son abundantes en carbohidratos, mientras que los consistentes en carne, pescado y huevo contienen alta cantidad de proteínas y lípidos. Están compuestos principalmente del 41 al 62% de carbohidratos biodegradables, del 15 al 25% de proteínas y del 13 al 30% de lípidos. Sin embargo, las características generales son: humedad del 74 al 90 %, SV entre 85%, pH alrededor de 5.1, baja relación C/N entre 13.2 y 24.50, baja presencia de metales pesados y proporciones variables de nutrientes y micronutrientes. Debido a sus características es considerado un sustrato adecuado para la digestión anaerobia (Harder et al., 2020).

2.2.1 Residuos de nopal

La estructura de la planta está formada por tallos aplanados modificados conocidos como cladodios. Estos se encuentran cubiertos de espinas y pelos multicelulares llamados tricomas que forman la areola característica de las cactáceas (Marin-Bustamante et al., 2017). Se cultiva en todo el mundo, en algunos países se cultiva para forraje comercial y los cladodios para consumo humano (Ramírez-Arpide et al., 2018).

Los nopales se dividen en dos grupos: *Opuntia* y *Nopalea*. El género *Opuntia* spp. pertenece al nopal verdura y se distribuye en regiones áridas y semiáridas, bosques mésicos, pastizales y bosques tropicales. Se cultiva en dieciocho estados de la República Mexicana, siendo los principales: Morelos (más de 392 mil toneladas), Ciudad de México (más de 227 mil toneladas) y Estado de México (más de 92 mil toneladas), ocupando áreas reducidas en riego (SAGAR, 2020). En la Ciudad de México, cada año el proceso de desespinado del nopal genera alrededor de 40,000 toneladas de desechos (Marin-Bustamante et al., 2017).

Actualmente, está disponible una cantidad limitada de información sobre la producción de energía de residuos de nopal. Sin embargo, los residuos de nopal se han identificado como una biomasa de alto rendimiento de metano. Su alto contenido de agua, bajo contenido de lignina y ausencia de inhibidores naturales favorecen los procesos de digestión anaerobia. El jugo del nopal contiene pectina y otros azúcares solubles, por lo que pueden utilizarse para la producción de biogás. La composición de los cladodios es diferente de la biomasa lignocelulósica por su alto contenido de pectina y un pequeño contenido de celulosa y lignina. El nopal es un sustrato adecuado para la digestión anaerobia. Sin embargo, su alto contenido de agua y carbohidratos lo hacen adecuado para la co-digestión con sustratos con baja relación carbono-nitrógeno, como el estiércol de todo tipo (Harder et al., 2020).

2.2.2 Agua residual de nixtamalización

México es centro de origen del maíz, alimento del que se registra una producción anual de más de 25 millones de toneladas (SAGAR, 2017). El nejayote es el subproducto de la nixtamalización del maíz (proceso alcalino de cocción con CaOH) para producir tortillas usando grandes cantidades de agua (entre 3:1 a 5:1 en peso, agua:maíz). Se estima que el volumen mensual de nejayote producido es de 1.2 millones de m³ (Harder et al., 2020).

Actualmente, no existe una demanda del nejayote ni regulación particular para el tratamiento y descarga, por lo que regularmente se descarga al drenaje (Harder et al., 2020) o en la superficie del suelo, derivando impactos ambientales en los ecosistemas, cambios en la composición del suelo, contaminación en los mantos freáticos y en la muerte de organismos acuáticos y terrestres (Vázquez-López et al., 2023). El nejayote posee ciertas características fisicoquímicas como pH entre 10 y 14, DQO de 13 a 40 g/L, alcalinidad de 180 a 3260 mgCaCO₃/L, alto contenido de carbohidratos del 71 al 75% ST (Harder et al., 2020) y una relación DBO₅/DQO de 0.4, indicando que corresponde a un residuo altamente

biodegradable a través de su tratamiento por procesos biológicos anaerobios con valorización energética (Vázquez-López et al., 2023).

2.3 Digestión anaerobia

La DA es una tecnología alternativa contra la incineración o el compostaje y se ha demostrado como un proceso bien establecido para el tratamiento de muchos tipos de residuos orgánicos sólidos o líquidos. Es el proceso biológico más rentable, debido a la alta recuperación de energía como biogás y su limitado impacto ambiental. Esta tecnología consiste en la degradación biológica de la materia orgánica por la acción de un consorcio microbiano que convierte sustratos orgánicos en metano y dióxido de carbono a través de una compleja ruta de reacciones metabólicas, que implica una serie de etapas paralelas y secuenciales como son: hidrólisis, acidogénesis (fermentación acidogénica), acetogénesis (deshidrogenación) y metanogénesis, cada una catalizada por un grupo particular de microorganismos (García-Gen et al., 2015).

Sin embargo, existen inconvenientes al realizar la digestión anaerobia con un solo sustrato (mono-digestión), como la inestabilidad del digestor, la disponibilidad limitada durante todo el año de algunas materias primas, presencia de metales pesados y bajo rendimiento de biogás. Por ejemplo, los residuos orgánicos fácilmente biodegradables como los residuos de alimentos dan lugar a una rápida acumulación de AGV inhibiendo el proceso. Por otro lado, los residuos ricos en proteínas (por ejemplo, residuos de mataderos) y las aguas residuales ricas en sulfatos pueden dar lugar a la generación de compuestos tóxicos como el NH_3 y H_2S , respectivamente (Karki et al., 2021).

2.4 Características de los residuos sólidos orgánicos para la producción de hidrógeno

Existe una amplia y enorme variedad de desechos orgánicos y lignocelulósicos que son potenciales materias primas para la producción de hidrógeno. El alto contenido de celulosa, carbohidratos y otros nutrientes disponibles son las razones para la producción potencial de hidrógeno (Srivastava et al., 2024), por lo que tiene una amplia gama de rendimientos debido a su composición variable y contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos (Moreno-Andrade et al., 2022).

Se ha observado que el rendimiento depende de la cantidad de SV o DQO por unidad. Para lograr la máxima disponibilidad de carbohidratos primarios y temprana producción de hidrógeno es necesario eliminar la barrera de lignina existente, junto con la conversión de carbohidratos complejos en azúcares primarios para la fermentación (Srivastava et al., 2024). Cabe destacar que los carbohidratos son los sustratos preferidos para las bacterias productoras de hidrógeno en la fermentación oscura, como las especies de *Clostridium* (Moreno-Andrade et al., 2022).

2.5 Fermentación oscura

La FO se puede definir como la fermentación acidogénica de materiales ricos en carbohidratos, sin luz ni oxígeno para producir hidrógeno. Durante la FO las bacterias productoras de hidrógeno utilizan los carbohidratos como sustrato para producir hidrógeno y subproductos intermedios, siendo estos últimos dependientes de parámetros operativos y otras condiciones ambientales. Para garantizar la viabilidad de la producción de hidrógeno un aspecto crucial es la disponibilidad de materia prima adecuada. Los desechos agrícolas y las aguas residuales que plantean desafíos ambientales pueden servir como recursos valiosos para la producción de hidrógeno (Rosa-e Silva et al., 2024). La FO utiliza principalmente bacterias anaerobias en oscuridad o altas temperaturas. Además de hidrógeno otros gases como el CO_2 , CO y H_2S se liberan en estas condiciones (Ahmad et al., 2024).

La FO se realiza en dos etapas (Figura 2), las cuales son: hidrólisis y acidogénesis (Salazar-Batres et al., 2022). En la hidrólisis, las sustancias orgánicas complejas que las bacterias no pueden utilizar directamente se descomponen en monómeros solubles como monosacáridos y aminoácidos. Este paso es llevado a cabo por microorganismos anaerobios obligados como *Bacteroides* y *Clostridia*, entre otras bacterias facultativas. La velocidad de descomposición dependerá de la naturaleza del sustrato, por lo que los carbohidratos (celulosa y hemicelulosa) tienden a descomponerse más lentamente que las proteínas. En la acidogénesis, las bacterias fermentativas acidogénicas convierten los productos de hidrólisis en ácidos orgánicos de cadena corta, es decir, los azúcares simples, los ácidos grasos y los aminoácidos se convierten en acetato, H_2 y CO_2 (70%), así como AGV y alcoholes (30%) (Aziz et al., 2021).

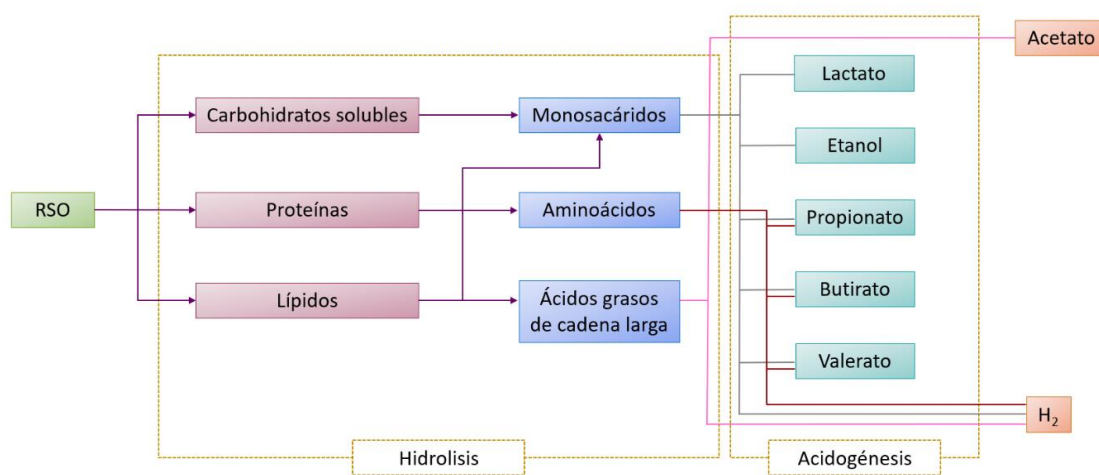


Figura 2. Pasos para la fermentación oscura y vías microbiológicas.

Fuente: Adaptado de Salazar-Batres et al., 2022.

2.6 Microorganismos presentes en la fermentación oscura

Las características del sustrato y las condiciones ambientales influyen en la composición microbiana y determinan el predominio de algún grupo de microorganismos (Salazar-Batres et al., 2022). La producción de hidrógeno a partir de residuos de alimentos está influenciada por la presencia de una comunidad microbiana productora de hidrógeno hidrolizante eficaz, que depende de la fuente del inóculo y el método de pretratamiento del inóculo (Moreno-Andrade et al., 2022).

Las bacterias productoras de hidrógeno se pueden dividir en tres grupos: anaerobios obligados formadores de esporas (por ejemplo, *Clostridium* spp.), anaerobios obligados no formadores de esporas (pertenecientes a los filos Firmicutes y Bacteroidetes) y anaerobios facultativos con metabolismo fermentativo, como los miembros de las familias Enterobacteriaceae y Bacillaceae, correspondientes a los géneros *Enterobacter* y *Bacillus*, respectivamente. Los microorganismos que realizan el proceso de fermentación oscura son anaerobios obligados o facultativos (Salazar-Batres et al., 2022). En la mayoría de los estudios, *Clostridium* es considerado el principal productor de hidrógeno, seleccionado mediante pretratamientos basados en choque de pH o control de pH (Moreno-Andrade et al., 2022).

Otro papel relevante para la producción de hidrógeno a partir de desechos de alimentos es la actividad hidrolítica, como la cepa *C. frigidicarnis*, que ha demostrado actividades sacarolíticas y proteolíticas; las *Pseudomonas* tienen el potencial de degradar proteínas y ácidos grasos; las *Bacteroides* se asocian con la degradación de la hemicelulosa; y las *Bifidobacterium* intervienen en la descomposición de sustratos como los oligosacáridos (Moreno-Andrade et al., 2022).

2.7 Co-digestión de residuos orgánicos

El término co-digestión significa la digestión simultánea de dos o más sustratos orgánicos (García-Gen et al., 2015). Brinda la oportunidad de superar los inconvenientes de la mono-digestión (Karki et al., 2021), ya que los sustratos al tener diferentes características se obtiene un efecto sinérgico (García-Gen et al., 2015).

Para aumentar la biodegradabilidad y producción de biogás, la co-digestión se puede llevar a cabo con diferentes tipos de residuos (Berrocal-Bravo, 2017). Este proceso ofrece seguridad y digestatos de mejor calidad para aplicaciones en la agricultura, reducción de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) y bacterias de resistencia a antibióticos (ARB) (Karki et al., 2021), mejor disponibilidad y balance de macronutrientes y micronutrientes para un buen crecimiento microbiano, balance de humedad, mejor capacidad amortiguadora, dilución de componentes inhibitorios y estabilidad en el proceso (Tyagi et al., 2018). Por ello es importante llevar a cabo la co-digestión con sustratos que tengan características compatibles y lograr así un efecto sinérgico en la mezcla.

Cuando se ocupan sustratos en mono-digestión con alto contenido de carbono y nitrógeno (p.ej. estiércol porcino) se presenta inhibición de hidrógeno por amoníaco, ya que este último conduce a una baja relación C/N, por lo que la co-digestión con otro sustrato rico en carbohidratos es esencial para ajustar esta relación dentro del rango óptimo. Esto evita la acumulación de amoníaco que inhibe el crecimiento de los microorganismos fermentadores (Hussien et al., 2024).

A pesar de que la co-digestión tiene múltiples beneficios, puede presentar efectos antagónicos debido a una proporción de mezcla de materias primas incompatible, provocando una sobrecarga orgánica, acidificación y fallo en el sistema. Sin embargo, para disminuir los riesgos se puede realizar la caracterización de compuestos orgánicos heterogéneos en las materias primas de los digestores y la comprensión de sus patrones de biodegradabilidad por lo que es necesaria la identificación inicial de la proporción óptima de mezcla de materias primas conjuntas (Karki et al., 2021).

2.8 Parámetros fisicoquímicos que afectan la fermentación oscura

2.8.1 pH

El pH se considera uno de los parámetros más importantes y sensibles que afectan el rendimiento de la FO, ya que pueden cambiar el espectro de subproductos, la estructura de la comunidad microbiana y las funciones metabólicas intracelulares (Elbeshbishy et al., 2017) como la actividad de la hidrogenasa y la duración de la fase de retraso (Ayodele et al., 2023).

Es posible aumentar la producción de hidrógeno si el valor de pH se mantiene entre 5.0 y 6.5 ya que en estas condiciones predominan las vías metabólicas del acetato y butirato. Si el pH se encuentra por debajo de 5.0 la producción de hidrógeno podría verse afectada, puesto que la actividad de la hidrogenasa podría inhibirse (Salazar-Batres et al., 2022). Una baja producción de hidrógeno se ha observado a un pH ácido ($\text{pH} < 4$) debido a la formación de metabolitos ácidos y alcohólicos que pueden penetrar la membrana celular microbiana e interferir con las actividades metabólicas regulares. Por el contrario, se ha encontrado que un pH neutro o alcalino ($\text{pH} > 7$) facilita la acumulación de propionato en lugar de producir hidrógeno (Elbeshbishy et al., 2017). Se ha informado que el pH óptimo para una alta producción de hidrógeno y una menor producción de disolventes se encuentra entre 5.5 y 6.5. Adicionalmente, la producción de butirato se ve más favorecida que la de acetato a un pH bajo (Kaushik et al., 2022).

2.8.2 Tamaño de partícula

La naturaleza o el tamaño de las partículas de la materia prima afectan al rendimiento de hidrógeno (Kalita & Sit, 2022). El tamaño de partícula es un factor crítico. La porosidad de las partículas debe permitir la transferencia de masa (Tosuner et al., 2019).

Se ha informado de que la molienda de sustratos con un tamaño inferior a 2 cm o superior a 5 cm produce una mayor cantidad de hidrógeno en comparación con el tamaño del sustrato entre 2 y 5 cm (Kalita & Sit, 2022).

2.8.3 Nutrientes

El nitrógeno es un macronutriente esencial para los microorganismos fermentativos, sin embargo, altas concentraciones pueden inhibir la actividad de los productores de hidrógeno (Elbeshbishy et al., 2017). Una relación óptima de C/N es crítica en cultivos mixtos o puros para aumentar la producción de hidrógeno, ya que el exceso de nitrógeno induce a la amonificación, lo que resulta en un aumento del pH intracelular del microorganismo que inhibe la función microbiana reduciendo la capacidad de producción de hidrógeno (Kalita & Sit, 2022).

El fósforo es uno de los principales macronutrientes inorgánicos y amortiguador de pH para el metabolismo microbiano, que influye significativamente en la producción de hidrógeno en la FO. Una concentración óptima de fósforo en el sistema de fermentación mejora la producción de hidrógeno acortando el tiempo de la fase de retraso microbiano y facilitando la producción de hidrógeno (Elbeshbishy et al., 2017). Sin embargo, cantidades elevadas en el medio inducen a una producción excesiva de AGV, lo que provoca una disminución significativa en el rendimiento de hidrógeno. El ATP es una forma de fosfato y proporciona una concentración óptima de fosfato en la célula bacteriana necesaria para la generación de energía y la regulación de la capacidad amortiguadora, además de actuar como alternativa al carbonato en el proceso fermentativo (Kalita & Sit, 2022). Sin embargo, estudios recientes sugieren que la concentración óptima de fósforo puede verse influenciada por la presencia de otros nutrientes y iones metálicos como nitrógeno y hierro (Elbeshbishy et al., 2017).

Los iones metálicos son necesarios para activar diversas enzimas y coenzimas relacionadas con el metabolismo microbiano, el transporte y el crecimiento celular. El hierro es un componente esencial de la ferredoxina y la hidrogenasa presentes en la célula bacteriana y es necesario para el mecanismo de transporte de electrones. Iones como Mg, Na, Zn y Fe influyen positivamente en el rendimiento de hidrógeno. Otro estudio afirma que el Cu, Zn y Fe aumentan la producción de hidrógeno (Kalita & Sit, 2022).

Una solución de sales utilizada para no tener un déficit de nutrientes y capacidad amortiguadora es la reportada por Carrillo-Reyes et al. (2019) compuesta por: 41.6 g NH₄Cl, 19.52 g de MES ((2-N-Morfolino) ácido etanosulfónico, 4-ácido morfolinetanosulfónico), 2

g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.6 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 40 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 40 mg KI, 8 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8 mg ZnCl_2 .

2.8.4 Composición de sustrato

La DA se puede producir a partir de una variedad de sustratos incluidos azúcares simples como la glucosa y la sacarosa (Ayodele et al., 2023). También, se puede producir a partir de sustratos con un alto contenido de materia orgánica, tal como residuos sólidos municipales, residuos agrícolas, residuos de comida y aguas residuales (García-Depraect et al., 2017), de esta manera obtener valiosos metabolitos con valor en el mercado. Para seleccionar el sustrato a ocupar se deben tomar en cuenta algunos criterios, como son: no ser utilizados para otros fines económicos, disponibilidad, tener un bajo costo o nulo, alto potencial de biogás para la fermentación o co-digestión con otro sustrato (Harder et al., 2020).

La biomasa lignocelulósica y los residuos orgánicos son considerados materiales complejos, los cuales son sustratos potenciales para ser convertidos en hidrógeno. La biomasa lignocelulósica se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, así como otros extractos y minerales que afectan su descomposición y rendimientos. La celulosa y la hemicelulosa son componentes de los carbohidratos (Aziz et al., 2021), los cuales se encuentran atrapados en una estructura cristalina compleja y por consecuencia, no son accesibles para ser utilizados por las bacterias fermentativas. Sin embargo, para poder llevar a cabo la FO de la biomasa lignocelulósica y hacerlos accesibles, primero hay que aplicar técnicas de pretratamiento como la explosión de vapor, el álcali o el tratamiento con ácido diluido (Elbeshbishy et al., 2017).

Sin embargo, la hemicelulosa incluye glucosa, galactosa, manosa, arabinosa y xilosa. Por último, la lignina es un polímero aromático formado a partir de precursores de fenilpropanoides. Se ha encontrado que la celulosa tiene una contribución más significativa que la hemicelulosa debido a su mayor contenido de hidrógeno. Además, la lignina parece tener el efecto opuesto de reducir la producción de hidrógeno debido a su tendencia de promover e involucrar en la hidrogenación (Aziz et al., 2021).

Antes de comenzar un proceso de digestión, el sustrato debe caracterizarse por el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas ya que se ha demostrado que son los principales compuestos del sustrato que influyen en la producción de hidrógeno en el proceso de FO. Mayores productividades se han asociado con sustratos con una mayor proporción de carbohidratos, mientras que sustratos con altas concentraciones de lípidos o proteínas se asocian a una baja o nula producción de hidrógeno (Tarazona et al., 2022).

La evidencia experimental sugiere que las vías metabólicas que conducen a la producción de hidrógeno en la FO están relacionadas principalmente con la descomposición glucolítica de los carbohidratos. Éstos son los preferidos para las bacterias productoras de hidrógeno de FO, como las especies *Clostridium* (Moreno-Andrade et al., 2022).

Los lípidos también son componentes críticos de la fisiología de las bacterias anaerobias necesarios para realizar funciones estructurales, de defensa, energéticas y de transporte. Sin embargo, no son un sustrato adecuado para los procesos de FO ya que la generación de hidrógeno a partir de ácidos grasos vía β -oxidación es termodinámicamente desfavorable en las condiciones estándar del proceso. Por otro lado, las proteínas realizan funciones catalíticas, energéticas, estructurales, de motilidad y de transporte, que mejoran el crecimiento de las bacterias fermentativas anaerobias y sus actividades biológicas, mejorando la producción de hidrógeno fermentativo (Tarazona et al., 2022).

2.8.5 Ácidos grasos volátiles

Los tipos de materia prima en los procesos anaerobios afectan cualitativamente a la producción de AGV (Sekoai et al., 2021). Los azúcares se convierten en hidrógeno y productos solubles definidos por una ruta metabólica. Los principales productos solubles son los ácidos acético, butírico, propiónico, valérico, láctico y disolventes como el etanol (Gomes-Silva et al., 2022).

Una fuente primaria de hidrógeno son las moléculas de glucosa que se encuentran en los carbohidratos y otras materias primas. Los subproductos generados durante las reacciones, denominados AGV afectan significativamente el rendimiento y la productividad del H_2 (Ahmad et al., 2024). La identificación de los ácidos formados durante la FO es vital para indicar las rutas metabólicas seguidas por los microorganismos para la producción de hidrógeno (Gomes-Silva et al., 2022).

En particular la glucosa se puede convertir en 4 moles de H_2 /mol de sustrato con ácido acético como coproducto (siendo este su máximo rendimiento teórico) y 2 mol de H_2 /mol de sustrato con ácido butírico como coproducto, por lo que el ácido acético es la vía metabólica preferida para producir hidrógeno (Ahmad et al., 2024).

En condiciones anaerobias, la degradación de carbohidratos procede a través de varias vías metabólicas como se muestra en la Tabla 2. Se ha demostrado que los flujos de residuos ricos en carbohidratos favorecen la mejora de las vías productoras de ácido acético y butírico, por lo que, los sustratos ricos en carbohidratos son fácilmente convertidos por las enzimas microbianas en azúcares monoméricos que se consumen inmediatamente en las vías acidogénicas durante la producción de AGV. Los lípidos y proteínas son menos adecuados para la producción de AGV debido a su composición química. La hidrólisis de los lípidos produce ácidos grasos de cadena larga que no son fácilmente degradados por los microorganismos acidogénicos, además de que se adhieren a la pared celular de las bacterias, lo que provoca que se inhiba el metabolismo de los microorganismos anaerobios. Las proteínas al tener una baja biodegradabilidad por su estructura terciaria y cuaternaria, las hace menos susceptibles a la descomposición enzimática, por lo que su eficiencia en la hidrólisis oscila entre 40 y 70%. Por lo tanto, la hidrólisis de las proteínas es considerado un paso limitante de la velocidad durante la acidogénesis (Sekoai et al., 2021).

Tabla 2. Reacciones típicas de degradación de glucosa en la FO

Reacciones	Ecuación
Producción de H₂	$\text{Glucosa} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{Acetato} + 2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2$
	$\text{Glucosa} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acetona} + 3\text{CO}_2 + 4\text{H}_2$
	$\text{Glucosa} \rightarrow \text{Butirato} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2$
Sin relación	$\text{Glucosa} \rightarrow 2\text{Lactato}$
	$\text{Glucosa} \rightarrow \text{Butanol} + 2\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$
	$\text{Glucosa} \rightarrow 2\text{Etanol} + 2\text{CO}_2$
Consumo de H₂	$\text{Glucosa} + 2\text{H}_2 \rightarrow 2\text{Propionato} + 2\text{H}_2\text{O}$
	$\text{Glucosa} + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}_2 \rightarrow 2\text{Succinato} + 2\text{H}_2\text{O}$
	$\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{Formiato}$

Fuente: Yun et al., 2018

2.9 Parámetros operacionales que afectan la fermentación oscura

Existen varios factores que afectan la fermentación oscura entre los que destacan la temperatura, la agitación y el origen del inóculo que se emplea en el proceso. La temperatura de fermentación es un parámetro que afecta la tasa de crecimiento de las bacterias y la eficiencia de conversión de los sustratos en hidrógeno. Las afinidades de temperatura de varias bacterias productoras de hidrógeno difieren, lo que probablemente conduce a diferentes vías de producción de hidrógeno y tasas de producción a partir de la FO (Chen et al., 2022).

Muchos investigadores han reportado efectos en la comunidad microbiana, la cinética, la estabilidad del proceso y el rendimiento del biogás. Las temperaturas de operación para los microorganismos productores de hidrógeno son: mesófilo (25 a 40 °C), termófilos (40 a 65 °C), extremadamente termófilos (65 a 80 °C) o hipertermofílicos (> 80 °C). La mayoría de los experimentos sobre la producción de hidrógeno a partir de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos que se encuentran en la literatura, se han llevado a cabo en condiciones mesófilas con un rango de temperatura predominante de 35 a 37 °C. Por otro lado, en experimentos realizados en condiciones termófilas, predomina una temperatura de 55 °C (Salazar-Batres et al., 2022).

Es probable que se requiera cierto grado de agitación, suspensión o recirculación de biogás para obtener una biodisponibilidad adecuada del sustrato para los microorganismos. Las condiciones de mezcla habituales para las pruebas por lotes oscilan entre 100 y 160 rpm; sin embargo, se encontró que el mezclado vigoroso continuo era inhibitorio para los reactores operados a una alta tasa de carga orgánica. Esto podría ser continuo y la mezcla rápida podría

promover una hidrólisis y fermentación más rápida, lo que posteriormente resulta en la acumulación de AGV cuando no se consumen, mientras que cuando se aplica una agitación mínima, podría resultar en una hidrólisis y fermentación más lentas, lo que permitiría que los sintrofos y metanógenos consuman los productos de fermentación sin la acumulación de estos compuestos.

La agitación también evita que el hidrógeno quede disuelto en el licor de mezcla, ya que se puede consumir hidrógeno en la generación de NADH_2 , obteniendo subproductos reducidos como propionato o lactato, y captación directa como hidrógeno molecular y CO_2 , que se pueden utilizar en acetato o metano por homoacetogénesis o metanogénesis (Salazar-Batres et al., 2022).

Se ha informado que las características del inóculo influyen en gran medida en los rendimientos de hidrógeno y las comunidades estables de microorganismos determinados en el reactor, por lo tanto, es necesario agregar un inóculo para iniciar el proceso de producción de hidrógeno (Salazar-Batres et al., 2022).

La variación en las fuentes de inóculo conduce a cambios en las vías metabólicas que gobiernan la producción de AGV. Típicamente, la distribución de los principales subproductos fermentativos refleja las principales vías metabólicas que son adoptadas por los consorcios microbianos durante el proceso acidogénico (Sekoai et al., 2021).

En el proceso de producción de hidrógeno interfiere una variedad de microbios fermentativos como bacterias aerobias (*Bacillus*), anaerobios obligados (*Clostridium*) y anaerobios facultativos (*E. Coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Rhodopseudomonas*), por mencionar los principales (Ananthi et al., 2024). Los anaerobios obligados producen 4 moles de H_2 /mol de glucosa, mientras que las bacterias anaerobias facultativas producen 2 moles de H_2 /mol de glucosa. La producción de hidrógeno utilizando anaerobios obligados y facultativos puede realizarse tanto por consorcios mixtos (suelo, residuos sólidos, compost orgánico, lodos anaerobios y estiércol bovino) como por consorcios puros (*E. Coli*, *Enterobacter* sp. y *Clostridium* sp.) (Sekoai et al., 2021).

Los consorcios mixtos son más adecuados para la producción de AGV debido a que poseen capacidad para metabolizar un amplio espectro de sustratos, tolerancia a pH ácido y alcalino, no requieren esterilidad para llevar a cabo el proceso y se reducen costos del proceso (Sekoai et al., 2021). Lo que los convierte en la mejor opción para la producción a escala industrial (Ananthi et al., 2024). Además, estos cultivos forman una relación sinérgica con otros microbios durante el proceso acidogénico, lo que resulta en la mejora de los AGV (Sekoai et al., 2021). En cambio, una desventaja de utilizar estos cultivos es que las bacterias consumidoras de hidrógeno pueden consumir fácilmente el hidrógeno creado por las bacterias productoras de hidrógeno (Ananthi et al., 2024).

Los metanógenos (bacterias consumidoras de hidrógeno) no son adecuados para la producción de AGV porque convierten estos metabolitos en metano durante la última etapa de la DA. Para inhibir la proliferación de los metanógenos durante la acidogénesis se han adoptado diversas estrategias (Sekoai et al., 2021) como las técnicas de pretratamiento para

mantener la actividad de las bacterias productoras de hidrógeno (Ananthi et al., 2024), debido a que, las bacterias productoras de hidrógeno se desarrollan en forma de espora con una capa que rodea su superficie celular para protegerlas del estrés ambiental, pero las bacterias consumidoras de hidrógeno carecen de esta capacidad, lo que facilita la eliminación selectiva de metanógenos utilizando diferentes agentes (Kaushik et al., 2022).

Para ello, el tratamiento con ácido, base, cloroformo, yodopropano, 2-Bromo sulfonato de etano, choque térmico, aireación, congelación y descongelación, son los más populares para mejorar la producción de hidrógeno en consorcios mixtos (Ananthi et al., 2024). El choque térmico predomina entre los pretratamientos más utilizados (Salazar-Batres et al., 2022).

2.10 Codigestion para la producción de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos

Teniendo en cuenta la problemática que presenta la disposición final de los residuos orgánicos y la necesidad de obtener energías limpias y renovables, se ha encontrado que el hidrógeno es una alternativa prometedora por su alto contenido energético y combustión amigable. Se puede producir hidrógeno mediante la FO de sustratos orgánicos, sin embargo, una alternativa para incrementar la producción de hidrógeno es la co-digestión debido a los efectos sinérgicos que se pueden obtener al mezclar los sustratos. En la Tabla 3 se muestran algunas investigaciones realizadas anteriormente para la producción de hidrógeno en mono-digestión y co-digestión mediante la fermentación oscura, utilizando diferentes tipos de sustratos orgánicos.

Vázquez-López & Moreno-Andrade (2024) realizaron la co-digestión de nejayote con residuos de alimentos. Mencionaron que al realizar la mezcla de estos sustratos se podría reducir el crecimiento de bacterias lácticas y la rápida acidificación del sistema debido a que la digestión anaerobia en mono-digestión de residuos de alimentos genera una rápida producción de AGV, lo que provoca la acumulación e inhibición del proceso. El experimento lo realizaron ajustando el pH inicialmente a 7.5 y sin ajuste posterior, alcanzando una productividad de 6.21 LH₂/L-d. Así mismo, realizaron la mono-digestión de residuos de alimentos y nejayote con las mismas condiciones de pH, obteniendo una productividad de 1.03 y 1.38 LH₂/L-d, respectivamente. Por lo que se puede observar que al mezclar estos sustratos se obtuvo un efecto sinérgico, incrementando la productividad.

Moreno-Andrade et al. (2022) llevaron a cabo la co-digestión de lodos activados residuales y residuos de alimentos. Encontraron que dentro de las ventajas de mezclar estos sustratos es el aumento la capacidad de amortiguación del sistema y la reducción de la inhibición del proceso debido a la acumulación de AGV. Realizaron el experimento con un pH inicial de 7.0 sin ajuste posterior, en el que obtuvieron una productividad de 0.14 LH₂/L-d. Así mismo realizaron la mono-digestión de residuos de alimentos con la misma condición de pH, obteniendo una productividad de 0.13 LH₂/L-d. Por lo que se observa que para esta mezcla de sustratos no se obtuvo un efecto sinérgico con el que se incrementara la productividad de hidrogeno.

Del Angel-Acosta et al. (2021) realizaron la co-digestión de agua residual de cervecería y nejayote, informaron que al mezclarlos se obtiene un sustrato rico en materia orgánica, así mismo, promueven valores de pH favorables para las bacterias productoras de hidrógeno al mezclar diferentes proporciones de sustratos. Llevaron a cabo el experimento con un pH inicial de 6.0 sin ajuste posterior, con el cual obtuvieron una productividad de 1.06 $\text{LH}_2/\text{L-d}$. De igual forma, realizaron la mono-digestión del nejayote con las mismas condiciones de pH, obteniendo una productividad de 0.34 $\text{LH}_2/\text{L-d}$. Se observa que hubo un efecto sinérgico al mezclar los dos sustratos en co-digestión ya que hubo un incremento en la productividad.

Carrillo-Verástegui et al. (2022) realizaron la mono-digestión del nopal, utilizando los cladodios sin espinas. Antes de utilizarlos realizaron un tratamiento el cual consistió en desinfección, trituración, secado al aire, molienda y tamizaje. El pH no se ajustó ni se controló durante la prueba, obteniendo una productividad de 1.69 $\text{LH}_2/\text{L-d}$. Al no haber trabajos reportados hasta la fecha en donde utilicen el nopal en co-digestión con otro sustrato no se puede concluir el que este sustrato al mezclarlo con otro tenga un efecto sinérgico.

Asociado a lo anterior, existe la necesidad de conocer el efecto de co-digestiones de residuos orgánicos de diferentes orígenes como cafetería, residuos de *Opuntia* y nejayote sobre la producción de hidrógeno para sentar las bases de posibles escalamientos del proceso en el futuro.

Tabla 3. Producción de hidrógeno a partir de diferentes tipos de sustratos

Sustrato	Origen	Ventajas de co-digestión	Pre-tratamiento	Sistema	Ajuste de pH	Productividad LH ₂ /L-d	Referencia
Nejayote/ Residuos alimentarios	Fábrica local productora de tortillas/ Mercado municipal	Podría reducir el crecimiento de bacterias lácticas y la rápida acidificación del sistema	N.A./ Trituración	Lote	Fijación de pH inicial de 7.5, sin ajuste posterior	6.21	Vázquez-López & Moreno-Andrade, 2024
Residuos alimentarios	Mercado municipal	-	Trituración	Lote	Fijación de pH inicial de 7.5, sin ajuste posterior	1.03	
Nejayote	Fábrica local productora de tortillas	-	-	Lote	Fijación de pH inicial de 7.5, sin ajuste posterior	1.38	
Lodos activados residuales/ Residuos de alimentos	Planta de tratamiento de aguas residuales municipales /Cafetería universitaria	Aumenta la capacidad de amortiguación del sistema y reduce la inhibición del proceso por la acumulación de AGV	Deshidratación con prensa /Trituración	Lote	Fijación de pH inicial de 7.0, sin ajuste posterior	0.14	Moreno-Andrade et al., 2022
				Semi-continuo	Fijación de pH inicial y control posterior a 5.5	0.73	
Residuos de alimentos	Cafetería universitaria	-	Trituración	Lote	Fijación de pH inicial de 7.0, sin ajuste posterior	0.13	
Aguas residuales de matadero/ Nejayote	Matadero/ Fábrica local productora de tortillas	Mejora la relación C/N	-	Lote	Fijación de pH inicial y control posterior a 5.5	0.19	Campos-Flores et al., 2023
Vinaza de tequila/ Nejayote	Fábrica de tequila/ Industria de procesamiento de maíz	Complementarios en concentraciones de nitrógeno, hierro, magnesio, fósforo y alcalinidad	N.A.	Lote	Fijación de pH inicial y control posterior a 5.5	2.57	García-Depraect et al., 2017

Sustrato	Origen	Ventajas de co-digestión	Pre-tratamiento	Sistema	Ajuste de pH	Productividad LH ₂ /L-d	Referencia
Agua residual de cervecería/ Nejayote	Fábrica de cerveza artesanal/ Fábrica tradicional de tortillas de maíz	Sustrato rico en materia orgánica. Promueve valores de pH más favorables para bacterias productoras de H ₂ al mezclar diferentes proporciones	N.A.	Lote	Fijación pH inicial de 6, sin ajuste posterior	1.06	Del Angel-Acosta et al., 2021
Nejayote	Fábrica tradicional de tortillas de maíz	-	N.A.	Lote	Fijación pH inicial de 6, sin ajuste posterior	0.34	
Opuntia	Mercado	-	Cladodios sin espinas, desinfectados, triturados, secados al aire, molidos y tamizados.	Lote	Sin fijación ni control durante prueba	1.69	Carrillo-Verástegui et al., 2022

3. JUSTIFICACIÓN

El crecimiento económico mundial, los avances tecnológicos y el aumento de la población impactan la demanda de energía primaria. Según la Agencia Internacional de Energía, la demanda mundial de energía aumentará un 1.3% cada año hasta 2040. Sin embargo, para satisfacer esta creciente demanda los combustibles fósiles han sido utilizados para la producción de energía, lo que genera problemas ambientales como la emisión de GEI (Rosa-e Silva et al., 2024). Además, la gestión ineficaz de los residuos contribuye a la contaminación ambiental, afectando principalmente a los habitantes de las zonas urbanas, teniendo como resultados desequilibrios ecológicos, el deterioro de las condiciones de salud y la liberación de GEI (Ahmad et al., 2024).

Los residuos de alimentos son unos de los residuos sólidos orgánicos más abundantes y problemáticos, los cuales representan entre el 15 y 63% del total de residuos sólidos municipales en todo el mundo (Yun et al., 2018). Por otra parte, el creciente volumen de eliminación de aguas residuales domésticas e industriales en los cuerpos de agua es motivo de gran preocupación por la contaminación ambiental (Rosa-e Silva et al., 2024). El biohidrógeno es un valioso combustible para resolver los problemas de producción de energía limpia y gestión de residuos (Ahmad et al., 2024). A su vez que se puede obtener hidrógeno durante el tratamiento de aguas residuales (Rosa-e Silva et al., 2024).

Entre las diversas rutas biológicas para la producción de hidrógeno, la FO es considerada la más factible (Yun et al., 2018) ya que es capaz de utilizar sustratos complejos con alto contenido de materia orgánica como residuos sólidos urbanos, residuos agrícolas y aguas residuales (García-Depraect et al., 2017). Desde una perspectiva ambiental, la FO tiene ventajas considerables en términos de huella de carbono (Rosa-e Silva et al., 2024). Sin embargo, al ocupar sustratos en mono-digestión para la producción de hidrógeno, estos pueden presentar algunos obstáculos. Tal es el caso de los residuos de alimentos, que presenta ciertas limitaciones técnicas como la rápida acidificación del sistema por acumulación de AGV y el crecimiento de bacterias del ácido láctico, que son el principal cuello de botella (Vázquez-López & Moreno-Andrade, 2024). De igual forma, la mono-digestión de aguas residuales como las obtenidas del proceso de nixtamalización del maíz presenta inconvenientes relacionados con una alta recalcitrancia, nutrientes desequilibrados y alcalinidad inadecuada (García-Depraect et al., 2017).

Por lo anterior, como estrategia para superar las limitaciones causadas por la mono-digestión de los residuos sólidos orgánicos como el de alimentos y las aguas residuales de nixtamalización (nejayote) se plantea la co-digestión de residuos sólidos orgánicos de cafetería, nejayote y residuos de nopal (*Opuntia*), con lo que se busca equilibrar la alcalinidad, contenido de materia orgánica, humedad y micronutrientes, al mismo tiempo que se obtiene un incremento en la producción de hidrógeno.

4. HIPÓTESIS

La producción de hidrógeno se ve favorecida al realizar la co-digestión de residuos sólidos orgánicos de cafetería, residuos de *Opuntia* y nejayote, en comparación con un proceso en mono-digestión de cada sustrato.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Evaluar la producción de hidrógeno en sistemas en lote mediante la co-digestión de residuos orgánicos de diferentes orígenes incluyendo cafetería, residuos de nopal (*Opuntia* spp.) y nejayote determinando las mejores condiciones operacionales.

5.2 Objetivos particulares

- Identificar el efecto de la mezcla de residuos sólidos orgánicos de cafetería, residuos de nopal y nejayote en la producción de hidrógeno en sistemas fermentativos en lote.
- Evaluar la eficiencia de degradación en co-digestión de la materia orgánica y la producción de metabolitos en la cual ese mejore la generación de hidrógeno en sistemas en lote.
- Evaluar la producción de hidrógeno en un reactor discontinuo secuencial a partir de una mezcla de residuos de nopal y cafetería, identificando los cambios en la comunidad microbiana.

6. ALCANCES

- Encontrar la mezcla de residuos sólidos orgánicos de cafetería, residuos de nopal y nejayote que tenga la mayor producción de H_2 en sistemas fermentativos en lote.
- Operación de un reactor SBR de 1.4L durante un mes con la mezcla de residuos de nopal y residuos de cafetería, con la que se obtuvo la mejor producción de hidrógeno en sistemas en lote.
- Identificar la comunidad microbiana para considerar parámetros de operación del reactor que favorezcan su crecimiento.

7. METODOLOGÍA

El presente estudio se enfocó en la co-digestión de diferentes residuos orgánicos, como son nejayote (N), residuos sólidos orgánicos de cafetería (RC) y residuos de *Opuntia* (RO) a diferentes proporciones, con el empleo de lodo anaerobio granular pretratado como inóculo, a fin de obtener la mejor producción de hidrógeno. El trabajo de investigación se llevó a cabo en 3 etapas. En la primera etapa se realizó la obtención, pretratamiento y caracterización de los tres sustratos, así como la preparación y caracterización del inóculo. En la segunda etapa se realizaron pruebas de co-digestión en lote con los sustratos. Inicialmente se estudió una concentración de 10 gSV/L y posteriormente a 21.7 gSV/L. Tales pruebas se realizaron en un equipo de medición automática de biogás (AMPTS-II, Bioprocess Control, Suecia). En la tercera etapa se alimentó un reactor SBR con la proporción de sustratos con la que se obtuvo la mejor producción de hidrógeno de la Etapa 2, así mismo, después se operó el reactor alimentado únicamente con *Opuntia* como control. Por último, se realizó la caracterización microbiana de las tres fases de cada experimento evaluado en el reactor. En la Figura 3 se presenta el esquema metodológico implementado en el presente estudio.

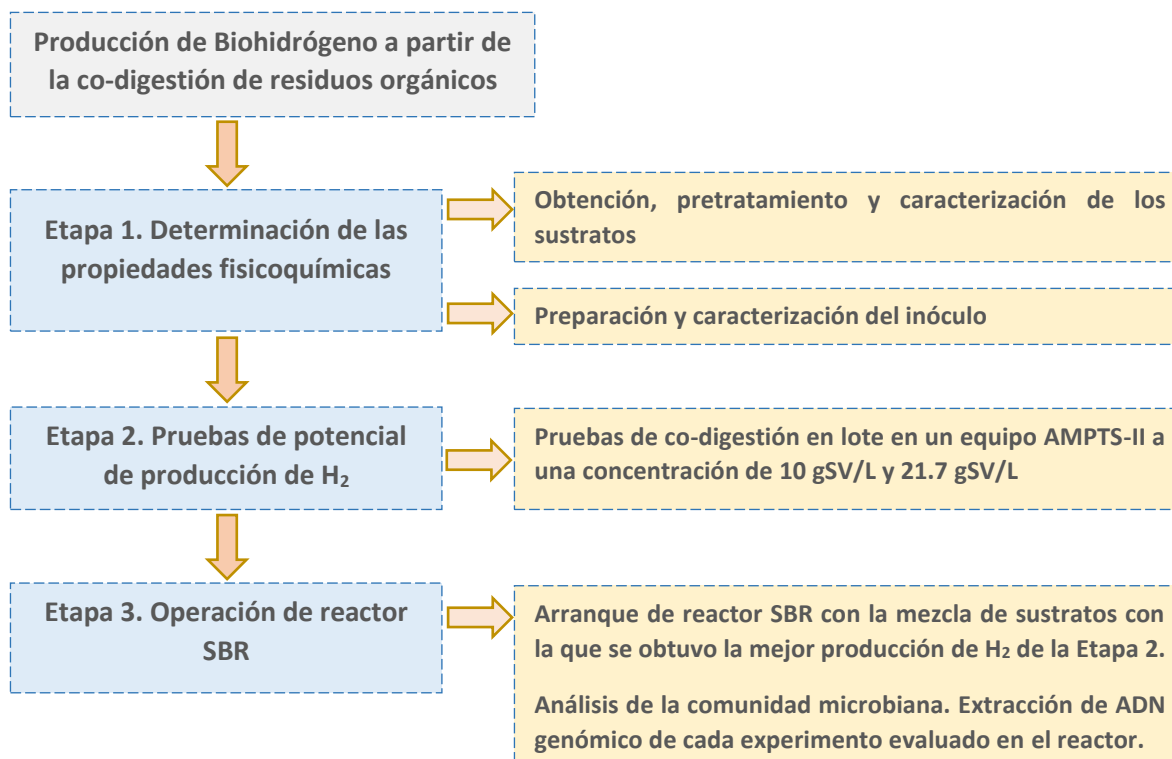


Figura 3. Esquema metodológico

7.1 Etapa 1. Determinación de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas

7.1.1 Obtención, pretratamiento y caracterización de los sustratos

El muestreo de los residuos orgánicos se realizó conforme el método de cuarteo establecido en la norma NMX-AA-15-1985 para conocer su composición de harinas, carnes, frutas y verduras. Se obtuvieron mezclas homogéneas y representativas de cada uno. Los residuos de *Opuntia* (Figura 4) y los residuos sólidos orgánicos de cafetería (Figura 6) se obtuvieron de una verdulería y un restaurante tipo cafetería en Juriquilla, respectivamente. El nejayote (Figura 5) se recolectó de una tortillería en Santa Rosa Jauregui. Todos los sitios pertenecientes al estado de Querétaro.



Figura 5. Residuos de *Opuntia*



Figura 6. Nejayote



Figura 4. Residuos sólidos orgánicos de cafetería

Como parte del pretratamiento de los residuos orgánicos, primero se descartaron materiales inertes como papel, plástico, cartón, material de metal y hueso, conservando únicamente la fracción orgánica que se encuentre presente en cada muestra. Después, todas las muestras se trituraron empleando un molino industrial de 1 HP de potencia (JR MJ22), después se tamizaron para obtener un tamaño de partícula menor a 0.5 mm (Villanueva-Galindo, 2020). Posteriormente, se almacenaron a -4°C para su preservación hasta el momento de ser utilizados.

Se llevó a cabo la caracterización de los sustratos para conocer sus propiedades fisicoquímicas en términos de pH, humedad, alcalinidad, DQO, densidad, ST, SV, SF, proteínas, carbohidratos, lípidos, COT, CIT y metales, de acuerdo con los métodos analíticos presentados en la Tabla 11 del apartado Anexos.

7.1.2 Preparación y caracterización del inóculo

Como inóculo para la producción de hidrógeno se empleó lodo anaerobio granular proveniente de una harinera, pretratado térmicamente a 105°C durante 24 horas para inhibir la actividad metanogénica y seleccionar microorganismos productores de hidrógeno formadores de esporas (Berrocal-Bravo, 2017). Después, se molió el lodo y se tamizó a través

de una malla #20 (850 μm), para posteriormente ser almacenado en un recipiente de vidrio sellado a temperatura ambiente hasta su uso (Castillo-Hernández et al., 2015). Los parámetros por determinar son el contenido humedad, ST, SV, SF de acuerdo con los métodos estándar (APHA, 2005).

7.2 Etapa 2. Potencial de producción de hidrógeno

Se llevaron a cabo ensayos en lote ocupando N, RC y RO en co-digestión, utilizando un diseño de experimento simple centroide y un modelo de mezclas para la optimización estadística. Las proporciones utilizadas fueron 100/0/0, 0/100/0, 0/0/100, 50/50/0, 50/0/50, 0/50/50, 33/33/33/, 66/16/16, 16/66/16 y 16/16/66 (v:v) de N, RC y RO respectivamente. Las diez mezclas se estudiaron con adición de inóculo, además como controles se analizaron individualmente el inóculo (0/0/0) y cada sustrato sin inóculo, con el fin de evaluar la producción de hidrógeno que tiene cada uno. En la Tabla 4 se muestran las proporciones analizadas, en donde el número uno se refiere al 100% del sustrato en la mezcla. Se llevaron a cabo dos experimentos a concentraciones diferentes, primero a 10 gSV/L y después a 21.7 gSV/L, en donde cada mezcla y control se realizaron por duplicado.

Tabla 4. Diseño experimental

Nejayote (N)	Residuos orgánicos de cafetería (RC)	Residuos de <i>Opuntia</i> (RO)
1	0	0
0	1	0
0	0	1
0.5	0.5	0
0.5	0	0.5
0	0.5	0.5
0.33	0.33	0.33
0.66	0.16	0.16
0.16	0.66	0.16
0.16	0.16	0.66
0	0	0
0	0	1
0	1	0
1	0	0

7.2.1 Pruebas de co-digestión en lote

Para llevar a cabo los experimentos en lote se ocupó un equipo AMPTS-II para realizar la medición automática del biogás, el cual se basa en el protocolo de producción específica de hidrógeno de la Red Latinoamericana de BioH₂ (Carrillo-Reyes et al., 2019). El equipo cuenta con una trampa de sosa el cual contiene una solución de absorción de NaOH 3N, para capturar el CO₂ producido. Se emplearon botellas Schott con un volumen de trabajo de 360 mL, a las que se le agregó 22.6 mL de medio mineral con nutrientes y MES, así como las proporciones de prueba establecidas en la Tabla 2.

Se empleó una relación So/Xo (sustrato/inóculo, g/g SV) de 2.7, considerando un volumen de trabajo de 360 mL. El pH inicial se ajustó a 7.5 utilizando HCl 5N o NaOH 5N. El espacio de cabeza de cada botella se purgó con nitrógeno por 30 s, para eliminar el oxígeno y de esa forma asegurar condiciones anaerobias. Se mantuvo una temperatura de 37 °C y una agitación de 120 rpm durante un minuto por tres minutos de descanso del motor, para evitar limitaciones de transferencia de masa. La curva de producción de hidrógeno se obtuvo automáticamente a través del software AMPTS-II. El experimento se finalizó hasta que la curva de producción de hidrógeno se vuelva asintótica.

7.2.2 Parámetros cinéticos

El modelo de Gompertz es empleado en numerosos estudios de producción de hidrógeno para la determinación de parámetros cinéticos. El modelo modificado describe el crecimiento de bacterias en cultivos en lote, mostrando una tasa de crecimiento específica que comienza en un valor de cero y posteriormente se acelera hasta un valor máximo (μ), lo cual ocurre en un periodo de tiempo denominado (λ), para finalmente llegar a la fase en la que la tasa de crecimiento disminuye y llega a cero donde se alcanza la asíntota. Cuando esta curva de crecimiento se define como el logaritmo del número de microorganismos con respecto al tiempo, los cambios en la tasa de crecimiento dan como resultado una curva sigmoidea con una fase lag justo después del tiempo igual a cero, seguida de la fase exponencial y finalmente una fase estacionaria (Villanueva-Galindo, 2020). Por lo tanto, los datos del volumen acumulado de hidrógeno se ajustaron a la ecuación modificada de Gompertz, la cual se expresa:

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

Donde: H es la producción acumulada de H₂ (NmL), λ es el tiempo de fase de retardo (h), t es el tiempo de cultivo (h), H_{max} es el potencial de producción de H₂ (NmL), R_{max} es la máxima tasa de producción de H₂ (NmL/h) y e = 2.718.

7.3 Etapa 3. Operación de reactor SBR

Se realizaron dos experimentos utilizando un reactor SBR a escala laboratorio de 1.2 L de volumen de trabajo (Figura 7). La velocidad de agitación se mantuvo a 60 rpm, un control de temperatura a 37 ± 1 °C por medio de un recirculador acoplado a un baño termostático a través de un enchaquetado que rodeaba el reactor y un pH inicial de 7.5 ajustado con NaOH. En la primera prueba, el reactor se alimentó con RO como control a una concentración de 10 gSV/L durante 14 ciclos de 24 h y TRH de 48 h, se inoculó con 10 gSV/L de lodo granular anaerobio pretratado térmicamente y se ajustó a un pH inicial de 7.5 con NaOH 5 N. En la segunda prueba, el reactor se alimentó de la mezcla en co-digestión con la que se obtuvo la mayor producción de hidrógeno en las pruebas en lote, la cual fue la proporción 50/50 (RO/RC) a una concentración de 10 gSV/L durante 15 ciclos de 24 h y TRH de 48h. Se inoculó con 10 gSV/L de lodo granular anaerobio pretratado térmicamente y se ajustó a un pH inicial de 7.5 con NaOH. En ambos casos no se reajustó el pH durante el experimento. Las condiciones anaerobias dentro del reactor se aseguraron haciendo pasar nitrógeno a través de la línea de purga. Para medir la producción de H₂ se empleó un medidor digital de flujo de biogás (μFlow).

Los parámetros de monitoreo del reactor fueron: SV, ST, carbohidratos, AGV, volumen de biogás y composición de biogás de acuerdo con Salazar-Batres et al. (2022).

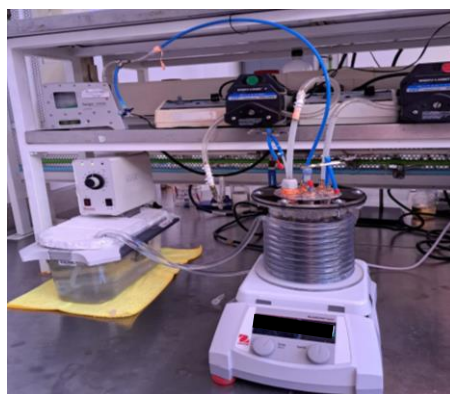


Figura 7. Reactor SBR para la producción de hidrógeno

7.4 Análisis de la comunidad microbiana

Los cambios en la estructura de la comunidad microbiana operando el reactor con RO, se estudiaron a partir de tres diferentes fases, identificadas como Arranque, Ciclo Final 6 y Ciclo Final 14; en el caso del reactor operado en co-digestión con RO/RC las tres fases estudiadas se identificaron como Arranque, Ciclo Final 6 y Ciclo Final 15.

El ADN genómico microbiano se aisló utilizando un kit de extracción DNeasy PowerSoil Pro de QIAGEN, conforme las instrucciones del proveedor. La cantidad y la calidad del ADN

extraído se determinaron con un espectrofotómetro NanoDrop-2000. La comunidad presente en el ADN extraído se analizó amplificando un gen 16s rADN y fue secuenciando mediante la plataforma MiSeq en un laboratorio externo (IMR Sequencing, Halifax, Canadá). Se emplearon cebadores universales para determinar todas las secuencias presentes (515F y 806R). Las secuencias se estudiaron analizando el paquete de software DADA2 v1.26.0 en el ambiente R. Las lecturas directas e inversas se filtraron y recortaron a 200 y 200 nucleótidos, respectivamente. Después, se juntaron las lecturas emparejadas y se eliminaron las quimeras. Se realiza el análisis de la distribución de longitudes de secuencia mediante la obtención de una tabla de variantes de secuencia amplificada (ASV, por sus siglas en inglés). La taxonomía se asigna a las variantes de secuencia utilizando el clasificador bayesiano entrenado con la versión v138 de SILVA.

8. RESULTADOS

8.1 Caracterización del inóculo

En la Tabla 5 se presentan las características del lodo anaerobio granular de una harinera (Figura 8), utilizado para la producción de hidrógeno (inóculo seco) en términos de humedad, ST, SV, SF y tamaño de partícula.

Tabla 5. Caracterización del inóculo

Parámetro	Unidades	Inóculo seco
Humedad	%	2.64 ± 0.02
ST	g/kg inóculo	973.57 ± 0.18
SV		731.59 ± 1.64
SF		241.98 ± 1.45
Tamaño de partícula	μm	800



Figura 8. Inóculo seco

8.2 Caracterización de los sustratos

En la Tabla 6 se presenta las características de los RO, RC y N, en términos de diferentes parámetros, siendo de los más importantes Carbohidratos, DQO y SV. Como resultados de sólidos volátiles se obtuvo $64.9 \text{ g/kg}_{\text{residuo}}$, $218.9 \text{ g/kg}_{\text{residuo}}$ y $17.2 \text{ g/L}_{\text{residuo}}$ para RO, RC y N, respectivamente. Siendo los RC los que presentaron el valor más alto, esto debido a la naturaleza del mismo sustrato, ya que está constituido en su mayoría por materia orgánica que puede ser fácilmente biodegradable.

De igual forma, los RC fueron los que tuvieron la mayor cantidad de carbohidratos con $131.06 \text{ g/kg}_{\text{residuo}}$, seguido de los RO con $18.82 \text{ g/kg}_{\text{residuo}}$, y por último el N con $12.09 \text{ g/L}_{\text{residuo}}$. Lo que resulta de gran importancia debido a que los carbohidratos son los sustratos preferidos de las bacterias productoras de hidrógeno.

Tabla 6. Caracterización fisicoquímica de los sustratos

Parámetro	RO	RC	N
pH	4.52 ± 0.00	4.34 ± 0.00	12.75 ± 0.00
Humedad	92.02 ± 0.00 %	76.38 ± 0.01 %	97.63 ± 0.01 %
Alcalinidad	0.00 ± 0.00 gCaCO ₃ /L	0.00 ± 0.00 gCaCO ₃ /L	4.30 ± 0.00 gCaCO ₃ /L
DQO	72.32 ± 4.38 gO ₂ /kg	301.15 ± 57.98 gO ₂ /kg	23.08 ± 0.74 gO ₂ /kg
Densidad	999.95 ± 1.99 g/kg residuo	1000.30 ± 3.06 g/kg residuo	1012.91 ± 1.45 g/L residuo
ST	79.80 ± 0.01 g/kg residuo	236.23 ± 0.08 g/kg residuo	23.65 ± 0.07 g/L residuo
SV	64.94 ± 0.11 g/kg residuo	218.92 ± 0.36 g/kg residuo	17.21 ± 0.15 g/L residuo
SF	14.86 ± 0.10 g/kg residuo	17.31 ± 0.28 g/kg residuo	6.44 ± 0.08 g/L residuo
Proteínas	49.71 ± 0.88 g/kg residuo	30.17 ± 2.49 g/kg residuo	13.24 ± 0.97 g/L residuo
Carbohidratos	18.82 ± 2.86 g/kg residuo	131.06 ± 2.30 g/kg residuo	12.09 ± 0.16 g/L residuo
Lípidos	0.37 ± 0.10 g/kg residuo	3.84 ± 2.76 g/kg residuo	0.07 ± 0.07 g/L residuo
COT	413.63 ± 0.93 g/kg residuo	534.28 ± 3.31 g/kg residuo	8.18 ± 0.15 g/L residuo
CIT	0.13 ± 0.23 g/kg residuo	ND	0.07 ± 0.02 g/L residuo
Cadmio (Cd)	< 0.001 g/kg residuo	< 0.001 g/kg residuo	NA
Cobalto (Co)	< 0.001 g/kg residuo	< 0.001 g/kg residuo	< 0.001 g/L residuo
Cromo (Cr)	< 0.001 g/kg residuo	0.02 g/kg residuo	NA
Cobre (Cu)	0.01 g/kg residuo	0.01 g/kg residuo	0.001 g/L residuo
Potasio (K)	44.55 g/kg residuo	10.96 g/kg residuo	Pendiente
Magnesio (Mg)	11.12 g/kg residuo	1.76 g/kg residuo	0.02 g/L residuo
Manganeso (Mn)	0.12 g/kg residuo	0.02 g/kg residuo	< 0.001 g/L residuo
Níquel (Ni)	0.01 g/kg residuo	0.02 g/kg residuo	< 0.001 g/L residuo
Plomo (Pb)	< 0.001 g/kg residuo	0.01 g/kg residuo	NA
Aluminio (Al)	0.20 g/kg residuo	NA	NA
Calcio (Ca)	30.98 g/kg residuo	NA	0.07 g/L residuo
Zinc (Zn)	0.03 g/kg residuo	0.03 g/kg residuo	0.01 g/L residuo
Fierro (Fe)	0.56 g/kg residuo	NA	0.59 g/L residuo
Sodio (Na)	NA	NA	0.01 g/L residuo

ND: No Detectado; NA: No Analizado.

En cuanto a la DQO, el valor más alto fue 301.15 g/kg_{residuo} por parte de los RC, en cambio, el N tuvo el menor valor de DQO con 23.08 g/L_{residuo}. Adicionalmente, el N obtuvo el pH más alcalino de 12.75, a diferencia de los RO y los RC que resultaron tener un pH ácido de 4.52 y 4.34, respectivamente.

A partir de estos resultados se puede inferir en los posibles efectos sinérgicos que pueden presentarse al mezclar los tres sustratos. Los RC tienen el mayor contenido de materia orgánica biodegradable, la cual puede ser fácilmente consumida por los microorganismos productores de hidrógeno e incrementar su producción. El N al tener el pH más básico, al mezclarse con los RC y RO que tienden a ser ácidos, puede ayudar a alcanzar más fácilmente el pH óptimo para la producción de hidrógeno. De igual forma, el N por su elevada alcalinidad puede disminuir el uso de agentes químicos para evitar la acidificación del sistema durante las pruebas. Los RO junto con el N poseen la mayor cantidad de humedad,

lo que favorece la FO. También están presentes algunos micronutrientes importantes en los RO que pueden favorecer el crecimiento celular y la producción de H₂.

8.3 Pruebas de co-digestión en lote

8.3.1 Concentración de 10 gSV/L

La Tabla 7 muestra los resultados del volumen acumulado de hidrógeno, rendimiento, productividad (con base a los resultados obtenidos experimentalmente) y el porcentaje de carbohidratos removidos para cada proporción estudiada de N, RC y RO. Los resultados muestran que se obtuvo el mayor volumen acumulado de hidrógeno en la mono-digestión de RC, seguido de los RO y por último el N. Sin embargo, al realizarse las co-digestiones no se obtuvo el efecto sinérgico esperado, obteniendo productividades menores a las alcanzadas en mono-digestión. Posiblemente este efecto se debe a una concentración elevada de compuestos fenólicos. Díaz-Montes & Castro-Muñoz (2022) han reportado que es posible generar compuestos fenólicos a partir de la fermentación del nejayote y Stintzing & Carle (2005), mencionan la presencia de compuestos fenólicos en las espigas del nopal.

Tabla 7. Resultados de pruebas en lote a 10 gSV/L

Proporción (N/RC/RO)	Vol. Acumulado (NmL H ₂)	Rendimiento (mL H ₂ /g Carbohidratosañadidos)	Rendimiento (mL H ₂ /g Carbohidratosremovidos)	Productividad real (mL H ₂ /L-d)	Carbohidratos removidos (%)
100/0/0	45.0 ± 15.5	11.71	59.22	37.5	19.11
0/100/0	191.3 ± 1.9	55.03	83.82	159.4	65.27
0/0/100	54.4 ± 8.8	11.65	21.99	45.3	52.84
50/50/0	29.0 ± 6.6	12.90	31.30	24.2	37.23
50/0/50	20.2 ± 0.4	9.22	20.20	16.8	45.56
0/50/50	47.4 ± 7.6	22.32	50.84	39.5	43.12
33/33/33	16.1 ± 0.2	9.05	21.67	13.4	39.18
66/16/16	9.8 ± 3.0	7.56	18.03	8.2	39.61
16/66/16	14.0 ± 8.9	8.35	17.72	11.7	45.51
16/16/66	9.9 ± 3.0	5.30	9.48	8.3	53.97

Se observó que con la proporción 0/50/50 de RC/RO se obtuvo la mayor productividad (39.5 mLH₂/L-d) en co-digestión, siendo aún mayor que la mezcla 33/33/33 donde todos los sustratos se encuentran en la misma proporción, posiblemente se deba a que estos dos sustratos tienen el mayor contenido de materia orgánica. De igual forma se observa que con los RC y RO en mono-digestión se obtienen el mayor volumen acumulado de hidrógeno. La co-digestión de N/RC (50/50/0) fue la segunda con mayor productividad, por lo que se observó que cuando se mezclan N y RO la productividad disminuye, probablemente a causa de los compuestos fenólicos que estos poseen.

La Figura 9 muestra el diagrama ternario con respecto al volumen acumulado de hidrógeno basándose en los diez puntos de diseño de la Tabla 7. Los resultados demostraron que con los sustratos en proporciones iguales no se obtiene un efecto sinérgico o un incremento en la producción de hidrógeno comparado con el volumen obtenido con los RC en mono-digestión. Se puede observar que al ir incrementando la proporción de RC en mezcla se presenta un incremento en la producción de hidrógeno, teniendo el mejor efecto en co-digestión con los RC/RO o con RC/N. Así mismo, se observa que al mezclarse los RO/N se presenta una disminución en el volumen acumulado de hidrógeno.

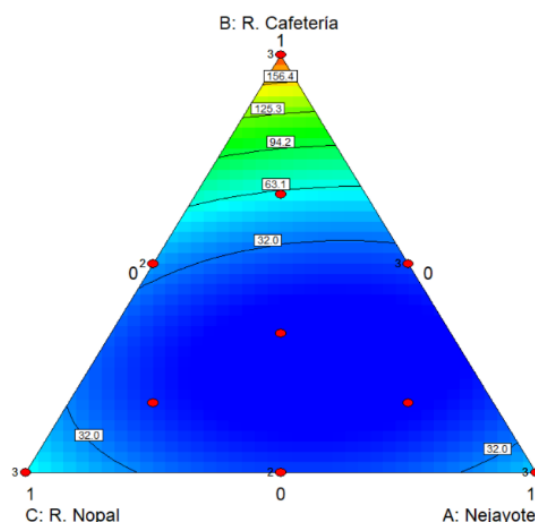


Figura 9. Volumen acumulado de H₂ producido a 10 gSV/L en pruebas en lote

En la Figura 10 se presenta la producción de AGV obtenidos en las diez mezclas de N/RC/RO. Los principales metabolitos obtenidos fueron ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido isovalérico y ácido succínico. Se puede observar que la producción de hidrógeno en mono-digestión de RC y N se ve favorecida por la vía del ácido butírico, mientras que para los RO por la vía de ácido acético. En cambio, para la producción de hidrógeno en co-digestión la principal ruta para la producción de hidrógeno es la del ácido acético. El pH final promedio de las mezclas fue de 6.0 ± 0.4 , encontrándose dentro de un pH de 5.0 y 6.5 considerado óptimo para la producción de hidrógeno (Salazar-Batres et al., 2022).

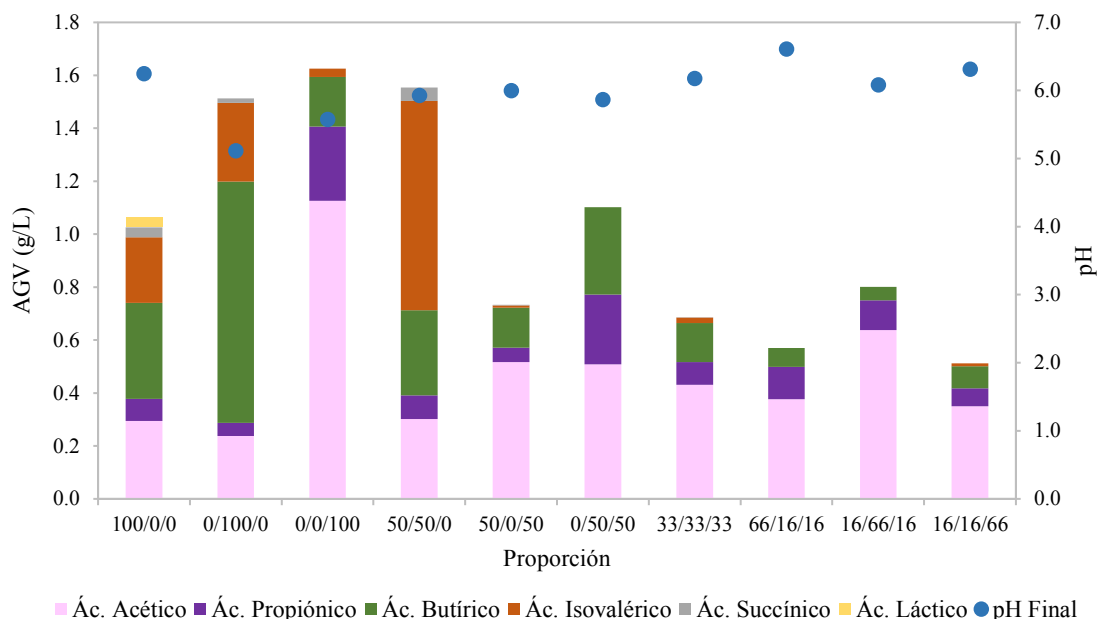


Figura 10. Principales metabolitos producidos a 10 gSV/L en pruebas en lote

8.3.1.1 Ajuste al modelo de Gompertz

Las pruebas en lote mostraron que la relación N/RC/RO con el mayor volumen acumulado de hidrógeno en co-digestión fue 0/50/50 con $47.4 \pm 7.6 \text{ mLH}_2$, seguido de 50/50/0 con $29.0 \pm 6.6 \text{ mLH}_2$ (Figura 11). Sin embargo, cuando en la mezcla están presentes únicamente N y RO (50/0/50) la producción de hidrógeno disminuye a $20.2 \pm 0.4 \text{ mLH}_2$. Esta respuesta también se observa en la relación 33/33/33 en donde los tres sustratos están en la misma proporción, por lo que este comportamiento sugiere que al encontrarse N y RO en la mezcla la producción de hidrógeno disminuye.

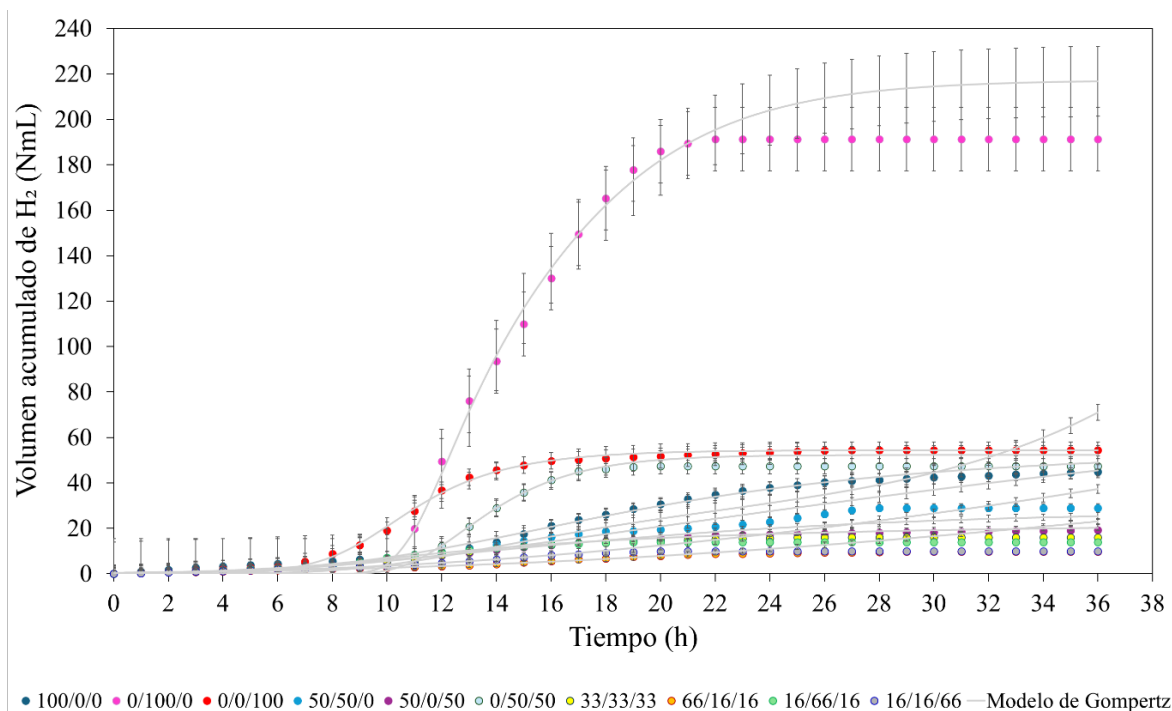


Figura 11. Cinética de la producción de H₂ a 10 gSV/L en pruebas en lote

Para analizar la producción de hidrógeno, las curvas del volumen acumulado de hidrógeno se ajustaron al modelo de Gompertz (Tabla 8). En general los resultados experimentales se ajustaron bien, obteniendo valores de R^2 superiores a 0.99. La mayor Hmax y Rmax en monodigestión se obtuvo con los RC con 217.3 mL y 34.1 mL/h respectivamente, sin embargo, en co-digestión se obtuvo la mayor Hmax con 66/16/16 (87.6 mL). No obstante, cuando se mezclan los tres sustratos el tiempo de la fase hidrolítica o de retardo (λ) es mayor que cuando se mezclan solo dos sustratos, en donde también se observa que entre las co-digestiones se alcanza la mayor Rmax con la mezcla 0/50/50 (8.8mL/h).

Tabla 8. Parámetros del modelo de Gompertz a 10 gSV/L

Proporción (N/RC/RO)	Hmax (mL)	Rmax (mL/h)	λ (h)	R²
100/0/0	54.9	2.5	6.8	0.99
0/100/0	217.3	34.1	11.3	1.00
0/0/100	54.4	8.1	7.3	1.00
50/50/0	56.1	4.1	8.7	0.99
50/0/50	27.7	1.1	4.8	1.00
0/50/50	52.4	8.8	10.7	1.00
33/33/33	82.9	2.2	10.8	0.99
66/16/16	87.6	1.3	11.4	0.99
16/66/16	22.0	1.3	4.6	0.99
16/16/66	57.9	8.1	32.4	0.99

8.3.2 Concentración de 21.7 gSV/L

Se llevó a cabo el segundo experimento de las pruebas en lote a 21.7 gSV/L con la finalidad de examinar si al incrementar la concentración se obtenía una mayor producción de hidrógeno. La Tabla 9 muestra los resultados del volumen acumulado de hidrógeno, rendimiento, productividad (con base a los resultados obtenidos experimentalmente) y el porcentaje de carbohidratos removidos para cada proporción estudiada de N, RC y RO. Los resultados mostraron que al igual que el experimento anterior, se obtuvo el mayor volumen acumulado de hidrógeno en la mono-digestión de RC, seguido de los RO y por último el N. De igual forma, al realizarse las co-digestiones no se obtuvo el efecto sinérgico esperado, obteniendo productividades menores a las alcanzadas en mono-digestión. Posiblemente este efecto se debe a una concentración elevada de compuestos fenólicos debido a lo mencionado por Díaz-Montes & Castro-Muñoz (2022) y Stintzing & Carle (2005). En este sentido, se observó que a pesar de ello para este caso, con la proporción 50/50/0 de N/RC se obtuvo la mayor productividad (99.9 mLH₂/L-d) en co-digestión, siendo aún mayor que la mezcla 33/33/33 donde todos los sustratos se encuentran en la misma proporción, posiblemente se deba a que estos dos sustratos tienen el mayor contenido de materia orgánica. Sin embargo, se observa que con los RC y RO en mono-digestión se obtienen el mayor volumen acumulado de hidrógeno. La co-digestión de RC/RO (0/50/50) fue la segunda con mayor productividad, por lo que se observó que cuando se mezclan N y RO la productividad disminuye de igual manera que en el primer experimento, probablemente a causa de los compuestos fenólicos que estos poseen.

Tabla 9. Resultados de pruebas en lote a 21.7 gSV/L

Proporción (N/RC/RO)	Vol. Acumulado (NmL H ₂)	Rendimiento (mL H ₂ /g Carbohidratosañadidos)	Rendimiento (mL H ₂ /g Carbohidratoremovidos)	Productividad real (mL H ₂ /L-d)	Carbohidratos removidos (%)
100/0/0	119.2 ± 3.3	13.91	29.07	99.3	47.9
0/100/0	394.8 ± 10.3	47.78	69.45	329.0	68.6
0/0/100	146.1 ± 78.2	22.48	68.25	121.8	31.3
50/50/0	119.9 ± 47.8	26.54	56.46	99.9	47.0
50/0/50	53.6 ± 10.1	13.76	49.00	44.6	27.1
0/50/50	102.1 ± 6.4	29.63	95.75	85.1	29.8
33/33/33	47.5 ± 7.4	15.73	41.26	39.5	38.1
66/16/16	29.0 ± 6.7	11.57	33.52	24.1	32.8
16/66/16	31.1 ± 9.1	13.16	40.47	25.9	32.5
16/16/66	35.9 ± 3.8	16.08	63.34	29.9	25.3

La Figura 12 muestra el diagrama ternario respecto al volumen acumulado de hidrógeno basándose en los diez puntos de diseño de la Tabla 9. Los resultados demostraron que con los sustratos en proporciones iguales no se obtiene un efecto sinérgico o un incremento en la producción de hidrógeno comparado con el volumen obtenido con los RC en mono-digestión. Se puede observar que al ir incrementando la proporción de RC en la mezcla se presenta un incremento en la producción de hidrógeno, teniendo el mejor efecto en co-digestión con los RC/RO o RC/N. Así mismo, se observa que al mezclarse los RO/N se presenta una disminución en el volumen acumulado de hidrógeno.

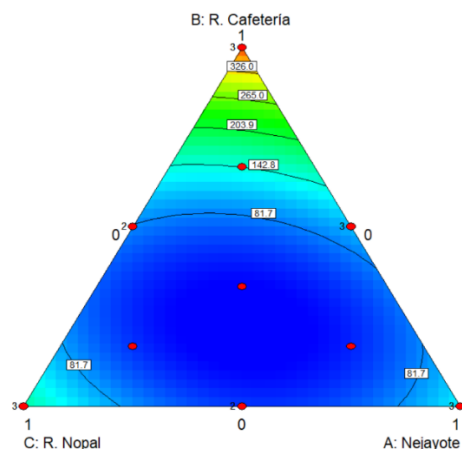


Figura 12. Volumen acumulado de H₂ producido a 21.7 gSV/L en pruebas en lote

En la Figura 13 se presenta la producción de AGV obtenidos en las diez mezclas de N/RC/RO. Los principales metabolitos obtenidos fueron ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido isovalérico y ácido succínico. Se puede observar que la producción de hidrógeno en mono-digestión de RC se ve favorecida por la vía del ácido butírico, mientras que para los RO y nejayote el ácido acético es la principal vía para la producción de hidrógeno. En cambio, en las co-digestiones la ruta predominante es la del ácido acético. El pH final promedio de las mezclas fue de 5.8 ± 0.3 , encontrándose dentro de un intervalo de pH de 5.0 y 6.5 considerado óptimo para la producción de hidrógeno (Salazar-Batres et al., 2022).

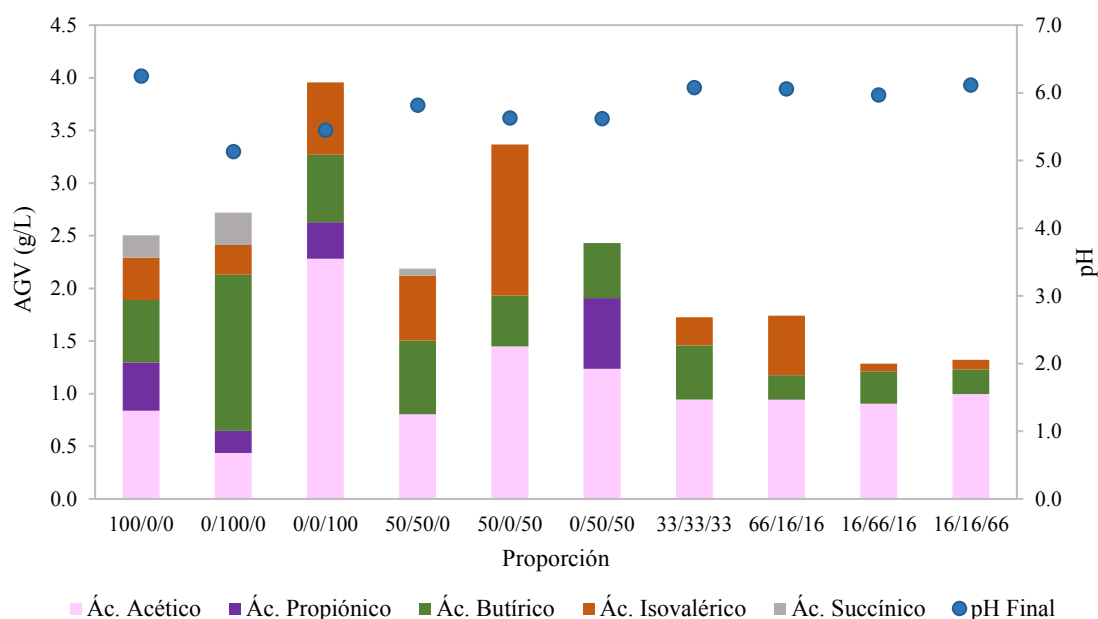


Figura 13. Principales metabolitos producidos a 21.7 gSV/L en pruebas en lote

8.3.2.1 Ajuste al modelo de Gompertz

Las pruebas en lote mostraron que la relación N/RC/RO con el mayor volumen acumulado de hidrógeno en co-digestión fue 50/50/0 con 119.9 ± 47.8 mLH₂, seguido de 0/50/50 con 102.1 ± 6.4 mLH₂ (Figura 14). Sin embargo, cuando en la mezcla están presentes únicamente N y RO (50/0/50) o en la misma proporción (33/33/33) ocurre el mismo comportamiento que en el experimento realizado a 10 gSV/L, el cual es una disminución en la producción de hidrógeno. Este comportamiento sugiere que al encontrarse N y RO en la mezcla la producción de hidrógeno disminuye. Posiblemente este efecto se debe a una concentración elevada de compuestos fenólicos presentes en el nejayote y en *Opuntia*, en donde Díaz-Montes & Castro-Muñoz (2022) han reportado que es posible generar compuestos fenólicos a partir de la fermentación del nejayote, así como Stintzing & Carle (2005) que mencionan la presencia de compuestos fenólicos en las espinas del nopal.

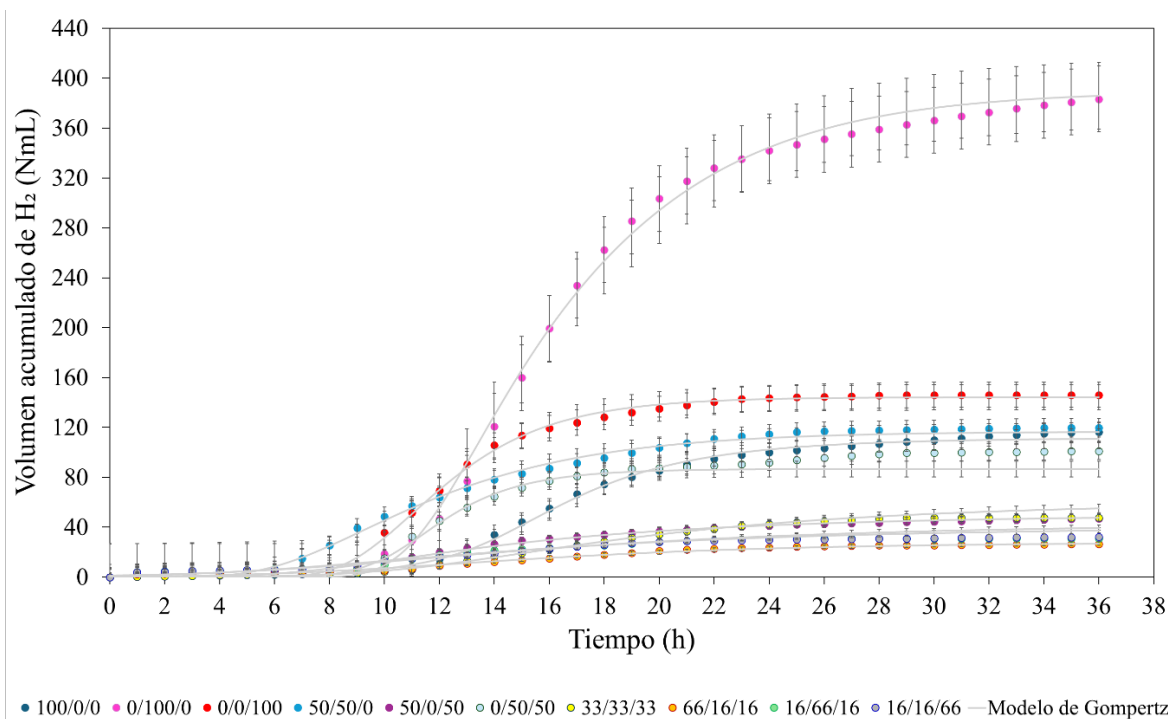


Figura 14. Cinética de la producción de H₂ a 21.7 gSV/L en pruebas en lote

Para analizar la producción de hidrógeno, las curvas del volumen acumulado de hidrógeno se ajustaron al modelo de Gompertz (Tabla 10). En general los resultados experimentales se ajustaron bien, obteniendo valores de R^2 superiores a 0.99.

Se puede observar que al igual que en el experimento anterior, se obtiene el mayor valor de H_{max} y R_{max} en mono-digestión con los RC (389.9 mL y 44.3 mL/h, respectivamente), sin embargo, en co-digestión se obtuvo la mayor H_{max} con 50/50/0 (116.7 mL), seguido de 0/50/50 (86.7 mL). Por otra parte, cuando se mezclan los tres sustratos el tiempo de la fase hidrolítica o de retardo (λ) es menor y cuando se mezclan dos sustratos el tiempo aumenta, lo que es un comportamiento contrario al presentado con el experimento a 10 gSV/L, lo que puede indicar que al aumentar la concentración de trabajo y utilizando más sustratos en co-digestión los microorganismos degradan más rápido la materia orgánica, sin embargo al utilizar tres sustratos ya sea a concentración de 10 gSV/L o 21.7 gSV/L la R_{max} es menor que al utilizar dos sustratos. Así mismo, se obtuvo que entre las co-digestiones en ambos experimentos la mayor R_{max} se alcanza con la mezcla 0/50/50 (8.8 mL/h a 10gSV/L y 15.5 mL/h a 21.7 gSV/L).

Tabla 10. Parámetros del modelo de Gompertz a 21.7 gSV/L

Proporción (N/RC/RO)	Hmax (mL)	Rmax (mL/h)	λ (h)	R²
100/0/0	111.7	11.8	10.8	1.00
0/100/0	389.9	44.3	11.5	1.00
0/0/100	144.3	20.1	8.6	1.00
50/50/0	116.7	11.8	6.8	0.99
50/0/50	50.1	3.4	6.4	0.99
0/50/50	86.7	15.5	9.2	0.99
33/33/33	59.9	3.4	9.2	1.00
66/16/16	28.1	1.4	5.0	0.99
16/66/16	43.9	1.9	2.3	0.97
16/16/66	41.0	1.8	2.3	0.98

8.4 Operación de reactor SBR

8.4.1 Arranque de reactor alimentado con Residuos de *Opuntia*

Un reactor SBR alimentado con RO fue puesto en operación por 14 ciclos como control. Se seleccionaron estos residuos como control debido a que, hasta la fecha es muy poca la información acerca del uso de este sustrato para la producción de hidrógeno y aún no hay publicaciones donde lo usen en un sistema en continuo.

Durante los 14 ciclos se cuantificó el volumen de hidrógeno producido y la composición de biogás. También, se monitoreó la remoción de carbohidratos, ST, SV y la producción de AGV. Por último, se realizó el análisis de la comunidad microbiana presente en el arranque, ciclo 6 y ciclo 14. En la Figura 15 se presenta la productividad de hidrógeno durante los 14 ciclos de operación del reactor, en donde la productividad promedio fue de 622.4 ± 73.6 mLH₂/L-d. En el ciclo 1 se obtuvo una productividad de 140.8 mLH₂/L-d, sin embargo, en los ciclos subsiguientes fue incrementando hasta alcanzar la máxima productividad en el ciclo 8 con 749.9 mLH₂/L-d. No obstante, posteriormente va disminuyendo hasta que en los ciclos 13 y 14 se mantiene constante a 525.0 mLH₂/L-d. En general, el comportamiento del reactor fue estable.

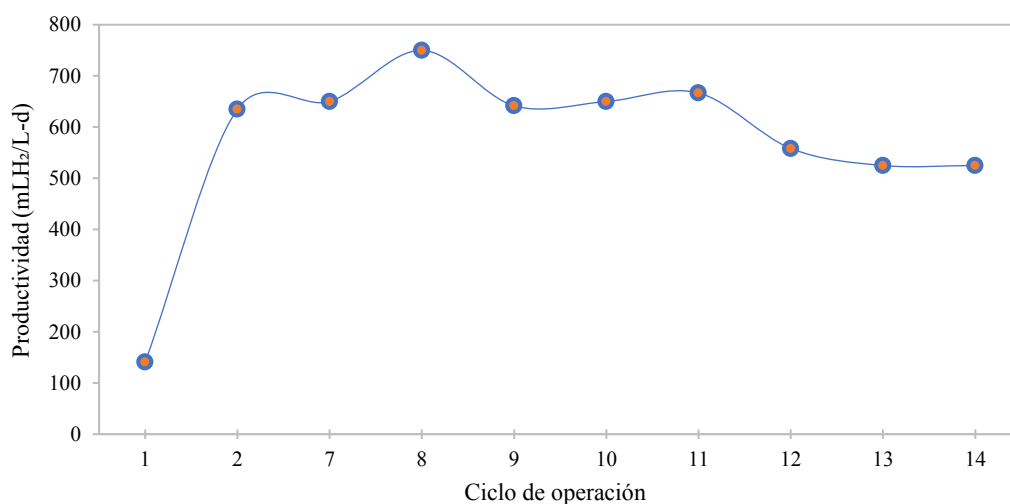


Figura 15. Productividad de H₂ durante la operación del reactor SBR alimentado con residuos de *Opuntia*

Se monitoreó la producción de AGV durante los 14 ciclos de operación del reactor (Figura 16). Los principales metabolitos generados fueron el ácido acético y ácido butírico, seguido del ácido propiónico; siendo el ácido acético la principal ruta para la producción de hidrógeno. Sin embargo, la producción de ácido propiónico, indica que hubo consumo de hidrógeno durante el experimento (Yun et al., 2018). La mayor concentración de AGV se obtuvo en el ciclo 8, siendo las concentraciones de ácido acético, ácido butírico y ácido

propiónico de 1.15, 0.23 y 0.17 g/L, respectivamente. El pH final promedio fue de 5.5 ± 0.2 , lo que muestra que no hubo acidificación en el sistema.

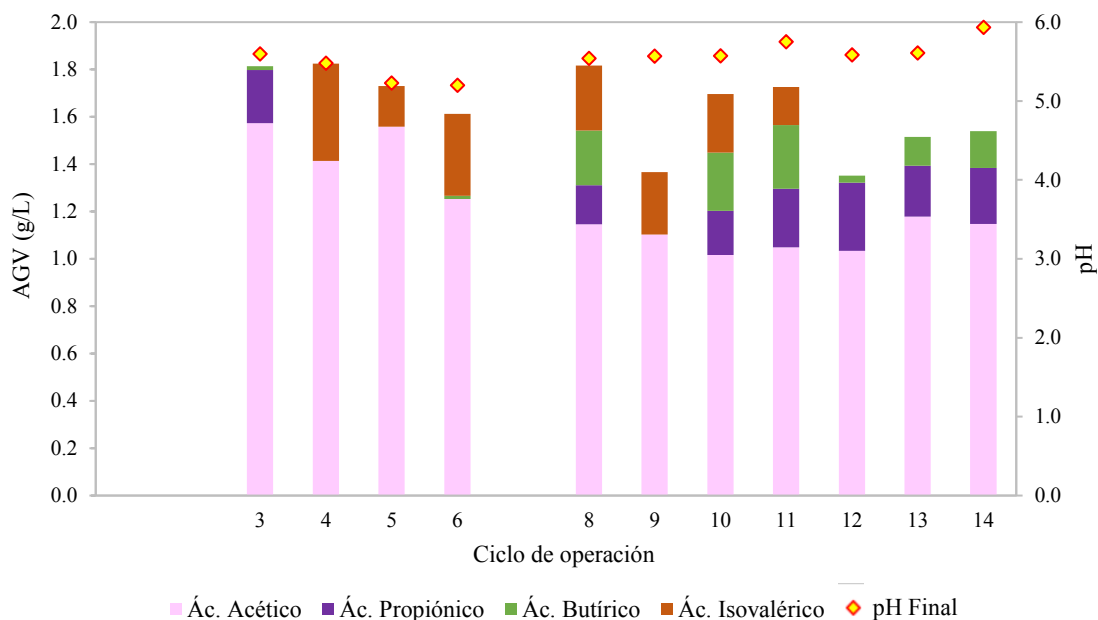


Figura 16. Principales metabolitos producidos durante la operación del reactor SBR alimentado con residuos de *Opuntia*

8.4.2 Arranque de reactor alimentado con Residuos de *Opuntia*/Residuos de Cafetería

De las pruebas en lote realizadas anteriormente se determinó que la proporción a evaluar en un reactor SBR sería 50/50 (RO/RC), ya que con esta se obtuvo la mayor productividad en co-digestión a una concentración de 10 gSV/L. El reactor fue puesto en operación por 15 ciclos. Durante ese tiempo se cuantificó el volumen de hidrógeno producido y la composición de biogás. También, se monitoreó la remoción de carbohidratos, ST, SV y la producción de AGV. Por último, se realizó el análisis de la comunidad microbiana en el arranque, ciclo 6 y ciclo 15.

En la Figura 17 se presenta la productividad de hidrógeno durante los 15 ciclos de operación del reactor, en donde la productividad promedio fue de 392.9 ± 59.3 mLH₂/L-d. En el ciclo 1 se obtuvo una alta productividad de 1449.9 mLH₂/L-d, sin embargo, en los siguientes ciclos la productividad disminuyó hasta que del ciclo 3 en adelante la productividad osciló entre 516.6 y 316.6 mLH₂/L-d. Este comportamiento posiblemente pudo ocurrir debido que los microorganismos presentes en el inóculo se estaban aclimatando a los componentes de los sustratos (Moreno & Buitrón, 2004), por lo que fue hasta el ciclo 3 donde los microorganismos alcanzaron a adaptarse, presentando subsecuentemente un comportamiento estable.

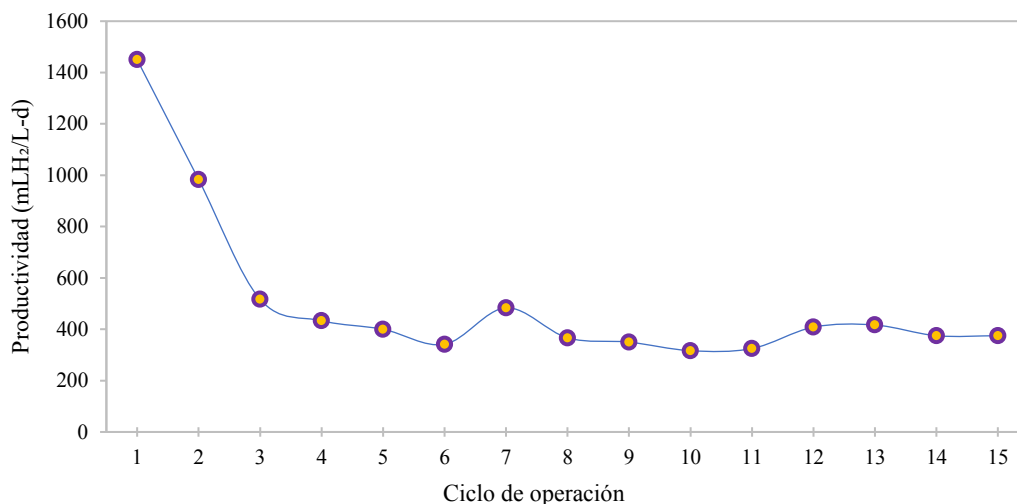


Figura 17. Productividad de H₂ durante la operación del reactor SBR alimentado en co-digestión

Se monitoreó la producción de AGV durante los 15 ciclos de operación del reactor (Figura 18). Los principales metabolitos generados fueron el ácido acético y ácido propiónico, seguido del ácido butírico; siendo el ácido acético la principal ruta para la producción de hidrógeno. Sin embargo, el ácido propiónico estuvo presente en todos los ciclos, lo que puede explicar el porqué de la disminución en la producción de hidrógeno. La mayor concentración de AGV se obtuvo en el ciclo 8, siendo las concentraciones de ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico de 0.64, 0.55 y 0.17 g/L, respectivamente. No hubo producción de ácido láctico, el cual es uno de los principales problemas al utilizar residuos de alimentos en monodigestión. El pH final promedio fue de 5.3 ± 0.1 , lo que indica que no ocurrió acidificación en el sistema.

En la operación del reactor alimentado con RO/RC, se obtuvo una degradación promedio de carbohidratos del 51%. En el ciclo 1 se removi6 el 92%, en donde el ácido butírico actu6 como la principal ruta para la producción de hidrógeno. Sin embargo, para los ciclos subsecuentes la degradación de carbohidratos disminuy6. Al haber menor concentración de carbohidratos se pudo haber favorecido la producción de ácido propiónico como lo obtenido por Antonopoulou et al. (2011).

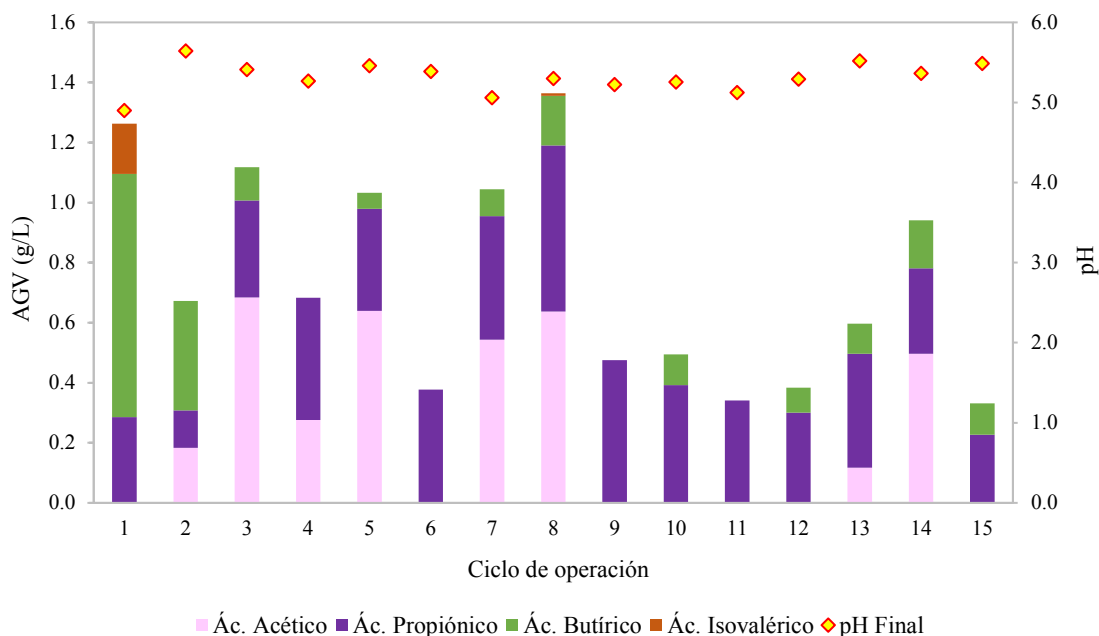


Figura 18. Principales metabolitos producidos durante la operación del reactor SBR alimentado en co-digestión

8.4.3 Análisis de la comunidad microbiana

Se tomaron muestras al inicio, durante y al finalizar la operación del reactor alimentado con RO y RO/RC, con la finalidad de analizar la comunidad microbiana presente en cada experimento. En el reactor alimentado con RO (Figura 19) se observó que los microorganismos más abundantes en el arranque fueron los No identificados con 62% de abundancia relativa, que pueden estar asociados a los microorganismos que se encontraban inicialmente en el inóculo. No obstante, en el ciclo 6 *Escherichia* se fue estableciendo como la bacteria productora de hidrógeno dominante con 64% de abundancia relativa, la cual se asocia con la producción de ácido butírico y ácido acético (Sharma & Melkania, 2018). Así mismo, se detectó la presencia de *Prevotella* y *Veillonella* con abundancias relativas cercanas al 10%. En el ciclo 14 *Escherichia* predominó como la bacteria productora de hidrógeno con una abundancia relativa del 61%, seguida de *Prevotella* (13%) la cual es capaz de fermentar hidrógeno a partir de carbohidratos produciendo ácido acético (Ohnishi et al., 2010); por último, *Veillonella* (4%) la cual degrada carbohidratos para generar ácido acético y ácido propiónico (Pachiega et al., 2019) además de producir hidrógeno cuando consume ácidos orgánicos (Villanueva-Galindo et al., 2023).

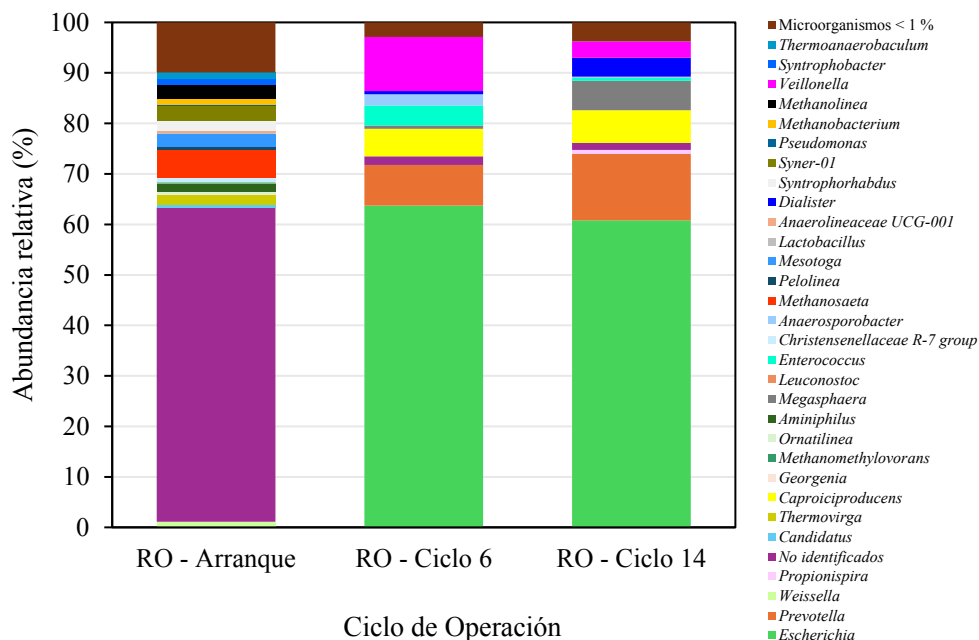


Figura 19. Clasificación taxonómica a nivel de género de microorganismos presentes en el arranque, ciclo 6 y ciclo 14 de la operación del reactor alimentado con residuos de *Opuntia*

En el reactor alimentado con RO/RC (Figura 20) se observó que los microorganismos más abundantes en el arranque fueron los No identificados con 36% de abundancia relativa, que pueden estar asociados a los microorganismos que se encontraban inicialmente en el inóculo. Sin embargo, en el ciclo 6 *Escherichia* se fue estableciendo como la bacteria productora de hidrógeno dominante con 78% de abundancia relativa, la cual se asocia con la producción de ácido butírico y ácido acético (Sharma & Melkania, 2018). Así mismo, se detectó la presencia de *Prevotella* con una abundancia relativa del 10%. En el ciclo 14 *Escherichia* predominó como la bacteria productora de hidrógeno con una abundancia relativa del 74%, seguida de *Prevotella* (8%) la cual es capaz de fermentar hidrógeno a partir de carbohidratos produciendo ácido acético (Ohnishi et al., 2010); por último, *Megasphaera* (10%) la cual utiliza carbohidratos para producir ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y pequeñas cantidades de hidrógeno (Ohnishi et al., 2010).

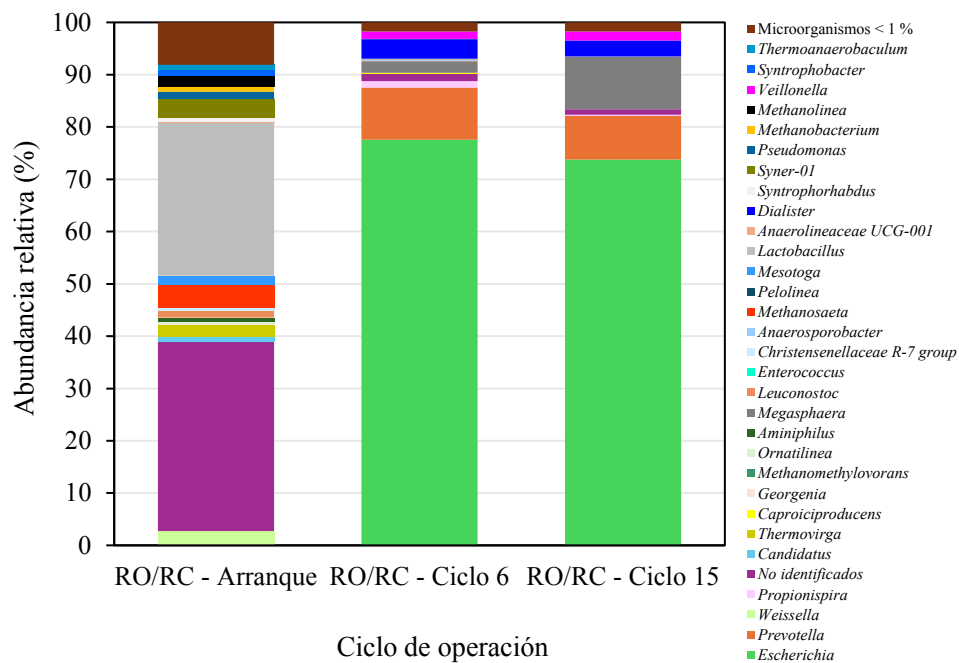


Figura 20. Clasificación taxonómica a nivel de género de microorganismos presentes en el arranque, ciclo 6 y ciclo 15 de la operación del reactor alimentado con residuos de *Opuntia*/residuos de cafetería

9. CONCLUSIONES

- En las pruebas en lote, los residuos sólidos orgánicos de cafetería tuvieron la mayor producción de H_2 en mono-digestión (191.3 NmL H_2), seguido de los residuos de *Opuntia* (54.4 NmL H_2) y nejayote (45.0 NmL H_2). Sin embargo, al mezclar los tres sustratos en co-digestión no se obtuvo el efecto sinérgico esperado, posiblemente debido a los compuestos fenólicos presentes en el nejayote y en los residuos de *Opuntia*. A pesar de ello, la mezcla de residuos sólidos orgánicos de cafetería-residuos de *Opuntia* en proporción 50/50 fue con la que se obtuvo la mayor producción de H_2 en co-digestión (47.4 NmL H_2)
- La mayor remoción de carbohidratos en las pruebas en lote se obtuvo en la proporción 50/50 residuos sólidos orgánicos de cafetería-residuos de *Opuntia*, en la que el ácido acético y el ácido butírico fueron los principales metabolitos productores de H_2 .
- Al operar el reactor discontinuo secuencial con residuos de *Opuntia* se alcanzó una productividad de 622 ± 73.6 mL H_2 /L-d, mientras que en la co-digestión 393 ± 59.3 mL H_2 /L-d. *Escherichia* fue la comunidad productora de H_2 más abundante al final de la operación del reactor, tanto para la mono-digestión de residuos de *Opuntia* como en la co-digestión de residuos sólidos orgánicos de cafetería-residuos de *Opuntia*. El principal metabolito presente en ambos casos fue el ácido acético.

10. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar una bioaumentación mediante la adición de microorganismos hidrolíticos como puede ser *Clostridium*, esto con el fin de mejorar la hidrólisis de los residuos de *Opuntia* en co-digestión. Con ello disminuir los efectos negativos que puede presentar *Opuntia* al tener características lignocelulósicas, por lo que *Clostridium* puede actuar como mediador directo de este tipo de sustrato a hidrógeno.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Agyekum, E. B., & Odoi-Yorke, F. (2024). Review of over two decades of research on dark and photo fermentation for biohydrogen production – A combination of traditional, systematic, and bibliometric approaches. *International Journal of Hydrogen Energy*, 91, 1149-1169.
- Ahmad, A., Krishnamoorthy, R., Hasan, S. W., Show, P. L., & Banat, F. (2024). Biohydrogen production through dark fermentation: Recent trends and advances in transition to a circular bioeconomy. *International Journal of Hydrogen Energy*, 52, 335-357.
- Ananthi, V., Ramesh, U., Paulraj, B., Kumar, P., Muthusamy, G., & Alagarsamy, A. (2024). A review on the impact of various factors on biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 52, 33-45.
- Antonopoulou, G., Gavala, H. N., Skiadas, I. V., & Lyberatos, G. (2011). Effect of substrate concentration on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(8), 4843-4851.
- APHA. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (21th edition)*. Washintong, DC.
- Ayodele, D. T., Ogunbiyi, O. D., Akamo, D. O., Otun, K. O., Akinpelu, D. A., Adegoke, J. A., . . . Oladoye, P. O. (2023). Factors affecting biohydrogen production: Overview and perspectives. *International Journal of Hydrogen Energy*, 48(71), 27513-27539.
- Aziz, M., Darmawan, A., & Juangsa, F. B. (2021). Hydrogen production from biomasses and wastes: A technological review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(68), 33756-33781.
- Berrocal-Bravo, M. J. (2017). Producción de hidrógeno y metano mediante codigestión de residuos alimenticios y lodos de purga. *UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO*.
- Campos-Flores, R. C., Reyna-Gómez, L. M., Suárez-Vázquez, S. I., Robledo-Olivo, A., & Cruz-López, A. (2023). Effect of Inoculum Pretreatment and Operational Mode of Reactor on BioH₂ Production from Nixtamalization (Nejayote) and Abattoir Wastewater. *Waste and Biomass Valorization*, 15, 2145-2158.
- Carrillo-Reyes, J., Tapia-Rodríguez, A., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., . . . Zaiat, M. (2019). A standardized biohydrogen potential protocol: An international round robin test approach. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(48), 26237-26247.
- Carrillo-Verástegui, K. A., Escamilla-Alvarado, C., Escárcega-González, C. E., Cano-Gómez, J. J., Paniagua-Vega, D., Nava-Bravo, I., & Ríos-Leal, E. (2022). Biohydrogen potential assessment of *Opuntia* spp.: Effect of inoculum-to-substrate ratio and residual biomass evaluation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(70), 30085-30096.
- Castillo-Hernández, A., Mar-Alvarez, I., & Moreno-Andrade, I. (2015). Start-up and operation of continuous stirred-tank reactor for biohydrogen production from

- restaurant organic solid waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(48), 17239-17245.
- Chen, H., Wu, J., Huang, R., Zhang, W., He, W., Deng, Z., . . . Qu, W. (2022). Effects of temperature and total solid content on biohydrogen production from dark fermentation of rice straw: Performance and microbial community characteristics. *Chemosphere*, 286, 131655.
- Del Angel-Acosta, Y. A., Alvarez, L. H., Garcia-Reyes, R. B., Carrillo-Reyes, J., Garcia-Gonzalez, A., & Meza-Escalante, E. R. (2021). Co-digestion of corn (nejayote) and brewery wastewater at different ratios and pH conditions for biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(54), 27422-27430.
- Díaz-Montes, E., & Castro-Muñoz, R. (2022). Analyzing the phenolic enriched fractions from Nixtamalization wastewater (Nejayote) fractionated in a three-step membrane process. *Current Research in Food Science*, 5, 1-10.
- Duan, Y., Pandey, A., Zhang, Z., Awasthi, M. K., Bhatia, S. K., & Taherzadeh, M. J. (2020). Organic solid waste biorefinery: Sustainable strategy for emerging circular bioeconomy in China. *Industrial Crops and Products*, 153, 112568.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Elbeshbishy, E., Dhar, B. R., Nakhla, G., & Lee, H. S. (2017). A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 656-668.
- García-Depraect, O., Gómez-Romero, J., León-Becerril, E., & López-López, A. (2017). A novel biohydrogen production process: Co-digestion of vinasse and Nejayote as complex raw substrates using a robust inoculum. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(9), 5820-5831.
- García-Gen, S., Sousbie, P., Rangaraj, G., Lema, J. M., Rodríguez, J., Steyer, J. P., & Torrijos, M. (2015). Kinetic modelling of anaerobic hydrolysis of solid wastes, including disintegration processes. *Waste Management*, 35, 96-104.
- Gomes-Silva, F., da Silva-Liduino, V., Ferreira-Leitão, V. S., & Cammarota, M. C. (2022). Biohydrogen from Pentose-Rich Lignocellulosic Biomass Hydrolysate. In *Organic Waste to Biohydrogen* (pp. 123-146). Springer.
- Harder, B., Noyola, A., Durán-Hinojosa, U., Moreno-Andrade, I., Morgan-Sagastume, J. M., Alatríste-Mondragón, F., . . . Leyva-Huitrón, R. (2020). Feedstock database for biogas in Mexico. Retrieved from https://ibtech.com.mx/uploads/medios/Feedstock%20database_final_230419.pdf
- Hussien, M., Jadhav, D. A., Le, T. T., Jang, J. H., Jang, J. K., & Chae, K. J. (2024). Tuning dark fermentation operational conditions for improved biohydrogen yield during co-digestion of swine manure and food waste. *Process Safety and Environmental Protection*, 187, 1496-1507.
- Kalita, B., & Sit, N. (2022). Biohydrogen from Fruit and Vegetable Industry Wastes. In *Organic Waste to Biohydrogen* (pp. 69-91). Springer.

- Karki, R., Chuenchart, W., Surendra, K. C., Shrestha, S., Raskin, L., Sung, S., . . . Khanal, S. K. (2021). Anaerobic co-digestion: Current status and perspectives. *Bioresource Technology*, 330, 125001.
- Kaushik, A., Mona, S. P., & Preet, R. (2022). Biohydrogen from Distillery Wastewater: Opportunities and Feasibility. In *Organic Waste to Biohydrogen* (pp. 93-121). Springer.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275.
- Marin-Bustamante, M. Q., Chanona-Pérez, J. J., Güemes-Vera, N., Cásarez-Santiago, R. G., Perea-Flores, M. J., Arzate-Vázquez, I., & Calderón-Domínguez, G. (2017). Production and characterization of cellulose nanoparticles from nopal waste by means of high impact milling. *Procedia Engineering*, 200, 428-433.
- Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J. W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*, 155, 330-333.
- Moreno, G., & Buitrón, G. (2004). Influence of the origin of the inoculum and the acclimation strategy on the degradation of 4-chlorophenol. *Bioresource Technology*, 94(2), 215-218.
- Moreno-Andrade, I., Berrocal-Bravo, M. J., & Valdez-Vazquez, I. (2022). Biohydrogen production from food waste and waste activated sludge in codigestion: influence of organic loading rate and changes in microbial community. *Chemical Technology & Biotechnology*, 98(1), 230-237.
- Moreno-Andrade, I., Salazar-Batres, K. J., Villanueva-Galindo, E., Cortez-Cervantes, J. F., Jimenez-Ocampo, U., Carrillo-Reyes, J., & Vargas, A. (2022). Biohydrogen from Food Waste. In *Organic Waste to Biohydrogen* (pp. 31-67). Springer.
- Ohnishi, A., Bando, Y., Fujimoto, N., & Suzuki, M. (2010). Development of a simple biohydrogen production system through dark fermentation by using unique microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(16), 8544-8553.
- Pachiega, R., Rodrigues, M. F., Rodrigues, C. V., Sakamoto, I. K., Varesche, M. B., De Oliveira, J. E., & Maintinguer, S. I. (2019). Hydrogen bioproduction with anaerobic bacteria consortium from brewery wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(1), 155-163.
- PROFECO. (2022). Evita el desperdicio de alimentos. Retrieved from <https://www.gob.mx/profeco/documentos/evita-el-desperdicio-de-alimentos>
- Ramírez-Arpide, F. R., Demirer, G. N., Gallegos-Vázquez, C., Hernández-Eugenio, G., Santoyo-Cortés, V. H., & Espinosa-Solares, T. (2018). Life cycle assessment of biogas production through anaerobic co-digestion of nopal cladodes and dairy cow manure. *Cleaner Production*, 172, 2313-2322.
- Rosa-e Silva, G., Carpane, T. G., Dos Santos, C. R., Casella, G. S., Moreira, V. R., de Paula, E. C., & Santos-Amaral, M. C. (2024). Biohydrogen production from wastewater: Production technologies, environmental and economic aspects. *Environmental Chemical Engineering*, 12(5), 114104.

- SAGAR. (2017). Nixtamalización, un proceso de tradición milenaria.
- SAGAR. (2020). El nopal, parte de la riqueza del campo mexicano. Retrieved from <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/el-nopal-parte-de-la-riqueza-del-campo-mexicano>
- Salazar-Batres, K., Quijano, G., & Moreno-Andrade, I. (2022). Biohydrogen from the Organic Fraction of Municipal Solid Waste. In *Organic Waste to Biohydrogen* (pp. 1-30). Springer.
- Sekoai, P. T., Ghimire, A., Ezeokoli, O. T., Rao, S., Ngan, W. Y., Habimana, O., . . . Hung, C. H. (2021). Valorization of volatile fatty acids from the dark fermentation waste Streams-A promising pathway for a biorefinery concept. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 143, 110971.
- SEMARNAT. (2016). *Informe de la situación del medio ambiente en México 2015*.
- SEMARNAT. (2019). *Informe de la situación del medio ambiente en México 2018*.
- SEMARNAT. (2020). *Diagnóstico básico para la gestión integral de los residuos*.
- Shah, A. V., Singh, A., Sabyasachi-Mohanty, S., Kumar-Srivastava, V., & Varjani, S. (2022). Organic solid waste: Biorefinery approach as a sustainable strategy in circular bioeconomy. *Bioresource Technology*, 349, 126835.
- Sharma, P., & Melkania, U. (2018). Effect of bioaugmentation on hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(15), 7290-7298.
- Srivastava, N., Singh, R., Lal, B., & Haque, S. (2024). Evaluation of bioprocess parameters for pilot scale fermentative biohydrogen production using organic waste: Environmental remediation, techno-economic challenges & future solutions. *International Journal of Hydrogen Energy*.
- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2005). Cactus stems (*Opuntia* spp.): a review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular nutrition and food research*, 49(2), 175-194.
- Tarazona, Y., Vargas, A., Quijano, G., & Moreno-Andrade, I. (2022). Influence of the initial proportion of carbohydrates, proteins, and lipids on biohydrogen production by dark fermentation: A multi-response optimization approach. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(70), 30128-30139.
- Tosuner, Z. V., Taylan, G. G., & Özmihçi, S. (2019). Effects of rice husk particle size on biohydrogen production under solid state fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(34), 18785-18791.
- Tyagi, V. K., Fernández-Güelfo, L. A., Zhou, Y., Álvarez-Gallego, C. J., Romero-García, L. I., & Ng, W. (2018). Anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW): Progress and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 93, 380-399.
- Vázquez-López, M., & Moreno-Andrade, I. (2024). Biohydrogen production by co-digestion of food waste and corn industry wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*.

- Vázquez-López, M., Jiménez-Ocampo, U. E., & Moreno-Andrade, I. (2023). Tratamiento anaerobio y valorización energética de las aguas residuales del proceso de nixtamalización del maíz: Una revisión. *AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica*, 16(1), 309-325. doi:<https://doi.org/10.22201/iingen.0718378xe.2023.16.1.85041>
- Villanueva-Galindo, B. E. (2020). Efecto de la bioaumentación sobre la producción de hidrógeno a partir de residuos de alimentos. *UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO*.
- Villanueva-Galindo, E., Vital-Jácome, M., & Moreno-Andrade, I. (2023). Dark fermentation for H₂ production from food waste and novel strategies for its enhancement. *International Journal of Hydrogen Energy*, 48(27), 9957-9970.
- Yun, Y. M., Lee, M. K., Im, S. W., Marone, A., Trably, E., Shin, S. R., . . . Kim, D. H. (2018). Biohydrogen production from food waste: Current status, limitations, and future perspectives. *Bioresource Technology*, 248, 79-87.

12. ANEXOS

12.1 Métodos analíticos

En la Tabla 11 se muestran los métodos analíticos que se emplearon en el presente estudio para la determinación de diferentes parámetros.

Tabla 11. Métodos analíticos

Parámetro	Método
Sólidos: ST, SV y SF	Gravimetría. (APHA, 2540-B).
Carbohidratos	Colorimétrico fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956).
Lípidos	Colorimétrico. Sulfo-fosfo vainillina descrito por Mishra et al. (2014).
Proteínas	Colorimétrico descrito por Lowry et al. (1951).
DQO	Colorimétrico. Digestión por reflujo cerrado a 150°C con reactivos preparados HACH, lectura a 600 nm (APHA, 5220-D).
Composición de biogás	Cromatógrafo de gases SRI 8610C equipado con un detector de conductividad térmica y una columna de Carboxen 1010 de 30m de largo. Las temperaturas del inyector, columna y detector fueron de 200, 100 y 230 °C, respectivamente. Se utilizó como gas de arrastre nitrógeno a un caudal de 4 mL/min.
Metales	Espectrometría de Absorción Atómica.
COT CIT	Analizador de Carbono Total.
AGV	Se determinaron tomando 1 mL de una muestra centrifugada, filtrada a 0.45 µm y con pH menor a 2.5, se utilizó un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama (FID) marca Agilen Tech 6890N VARIAN 330C, equipado con una columna capilar de sílice Zebram ZB-FFPA de 0.53 mm de diámetro, 15 metros de largo y 1 µm de espesor de película. La temperatura inicial del horno se fijó a 55 °C por tres minutos y posteriormente se programó un incremento de temperatura a una tasa de 45 °C por minuto hasta llegar a 135 °C, la temperatura del inyector fue de 190 °C, la temperatura del detector fue de 210 °C y el gas acarreador fue nitrógeno.
Comunidad microbiana	La extracción del ADN se realizó con el Kit Power Soil DNA Extraction kit® (Mo Bio Laboratories Inc., Carlsbad, C. A., USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis del ADN se realizó por un servicio externo de secuenciación masiva en el Research and Testing Laboratory, RTL (Lubbock, Texas, USA), el cual lleva a cabo el protocolo de secuenciación usando la plataforma MiSeq.

12.2 Curvas de Calibración

Se elaboraron curvas de calibración de carbohidratos, proteínas y lípidos, con el fin de tener un rango de trabajo confiable respecto al coeficiente de correlación y así poder calcular la concentración de esos tres parámetros en los residuos sólidos orgánicos de cafetería, residuos de nopal y residuos de nixtamalización.

Dependiendo del contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos que tiene la materia orgánica, la producción de H_2 tendrá una amplia gama de rendimientos (Moreno-Andrade et al., 2022). Las productividades más elevadas de H_2 se han asociado al uso de sustratos ricos en carbohidratos, mientras que las producciones bajas o nulas se relacionan con proporciones elevadas de lípidos y proteínas. En cuanto a la rapidez de la reacción, la hidrólisis de carbohidratos se lleva a cabo en cuestión de horas, a diferencia de la hidrólisis de proteínas y lípidos que se realiza en términos de días (Villanueva-Galindo, 2020).

El conocer las concentraciones que tienen los residuos sólidos orgánicos de cafetería, residuos de nopal y residuos de nixtamalización, permitirá establecer la relación que existe entre el contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos respecto a las proporciones de prueba que se ocuparán en el experimento para obtener la mayor producción de H_2 .

12.2.1 Curva de calibración de Carbohidratos

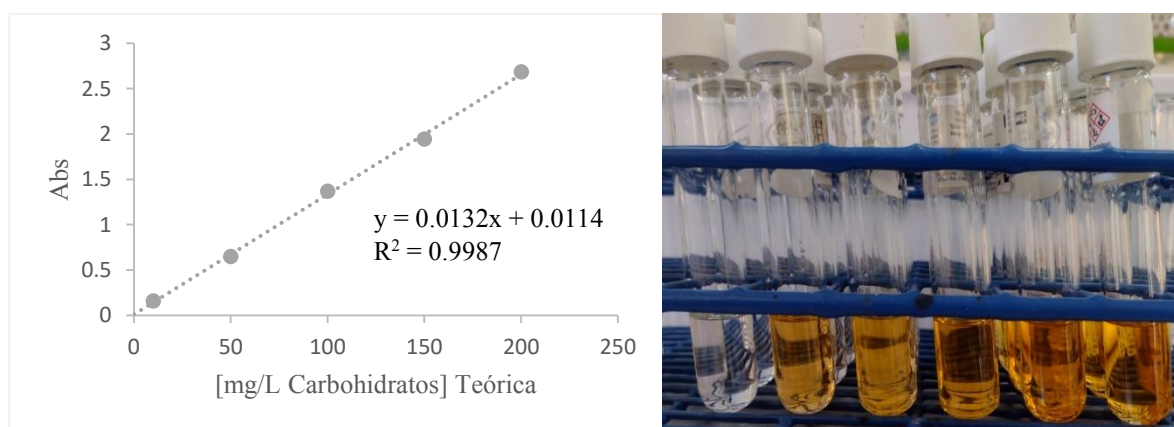


Figura 21. Curva de calibración de carbohidratos

Solución estándar: Glucosa 1000 mg/L

Longitud de onda: 490 nm

Concentraciones: 10, 50, 100, 150 y 200 mg/L

12.2.2 Curva de calibración de Proteínas

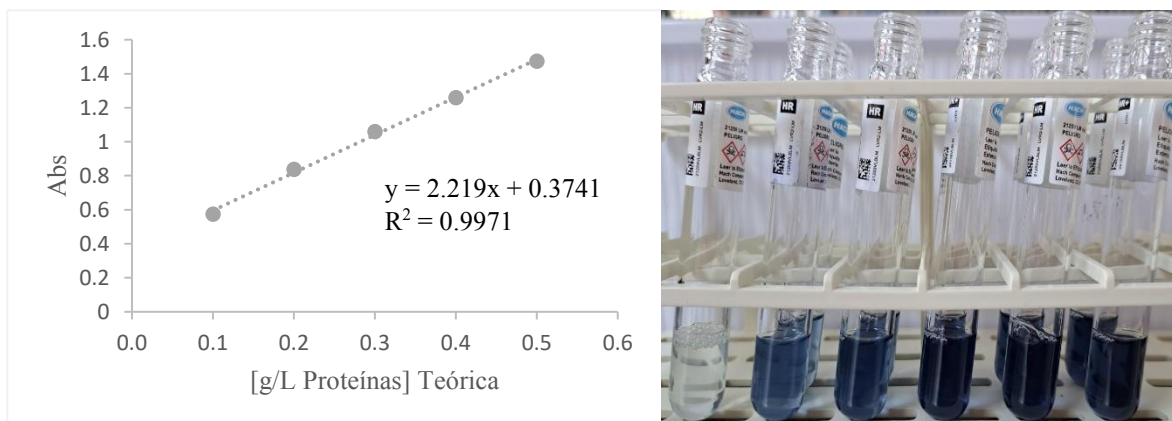


Figura 22. Curva de calibración de proteínas

Solución estándar: Albúmina de suero bovino 4 mg/mL

Longitud de onda: 750 nm

Concentraciones: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, y 0.5 g/L

12.2.3 Curva de calibración de Lípidos

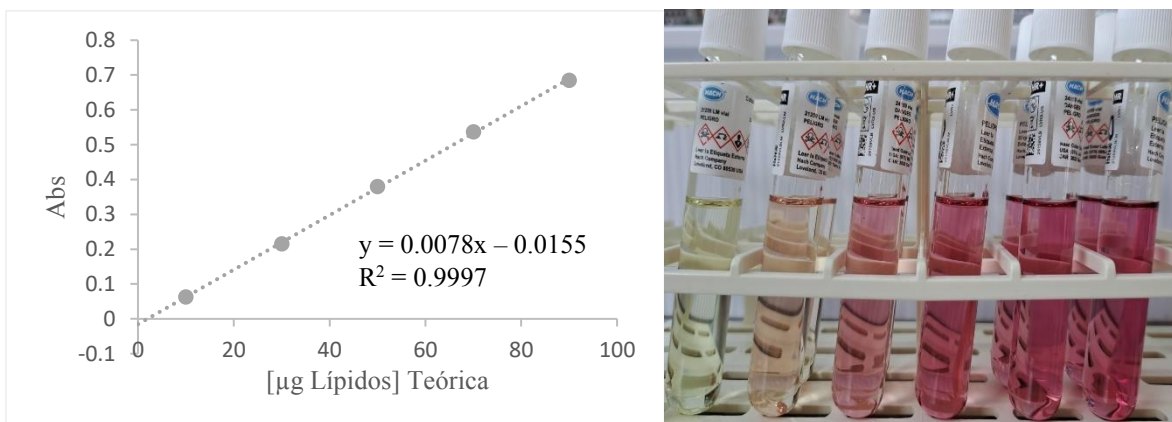


Figura 23. Curva de calibración de lípidos

Solución estándar: Aceite de olivo 20 mg/10 mL cloroformo

Longitud de onda: 530 nm

Concentraciones: 10, 30, 50, 70 y 90 µg