



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

EFFECTO DE LA CARGA ORGÁNICA SOBRE LA PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE
HIDRÓGENO A PARTIR DE RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS EN UN
REACTOR CONTINUO

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

PRESENTA:
ALFONSO CASTILLO HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL
IVÁN MORENO ANDRADE, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR
MARÍA NEFTALÍ ROJAS VALENCIA, INSTITUTO DE INGENIERÍA
CONSTANTINO GUTIÉRREZ PALACIOS, FACULTAD DE INGENIERÍA

MÉXICO, D. F. SEPTIEMBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Germán Buitrón Méndez
Secretario: Dra. María Teresa Orta Ledesma
Vocal: M.I. Constantino Gutiérrez Palacios
1^{er} Suplente: Dra. María Neftalí Rojas Valencia
2^{do} Suplente: Dr. Iván Moreno Andrade

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA) de la
Unidad Académica de Juriquilla del Instituto de Ingeniería, UNAM

TUTOR DE TESIS:

Dr. Iván Moreno Andrade

Agradecimientos

Esta tesis se la quiero dedicar en especial a mi madre por su gran apoyo y por su esfuerzo para que yo tuviera las condiciones necesarias para mi desarrollo profesional, sin tu apoyo esto no hubiera sido posible, a mis hermanos quienes han contribuido mucho en el desarrollo de mi vida y a Miriam Reyes por enseñarme el valor sentimental de la vida.

Quiero agradecer en primer lugar al Dr. Iván Moreno Andrade, por haber compartido su conocimiento, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis, por incluirme en un excelente grupo de trabajo y por haberse preocupado por mi desarrollo profesional.

Así mismo quiero expresar un fraternal agradecimiento a todos los integrantes del grupo de trabajo del LIPATA en particular los que trabajan la línea del hidrógeno: al Dr. German Buitrón, al M. B. Jaime Pérez, al Dr. Alejandro Vargas y a la M. C. Gloria Moreno, por sus consejos y por haberme facilitado mi estancia en el laboratorio.

La M. B. Ivonne Mar Álvarez fue una parte fundamental para la ejecución de esta tesis ya que me brindó su apoyo durante la operación de reactor continuo y en el análisis microbiológico.

Se agradece a mis compañeros de generación que siempre me brindaron su apoyo: al I. A. Alberto Villa, a la I. A. Liz Arango, al M. B. Víctor Servando.

Por último, mil gracias a mí querida Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de ingeniería por su excelente programa de posgrado.

Gracias a todos sin su apoyo no lo hubiera conseguido.

APOYOS RECIBIDOS

Esta tesis fue desarrollada 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 el apoyo financiero del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General Asuntos del Personal Académico-UNAM a través del proyecto IN103315.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría.

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Objetivos	6
Objetivo general.....	6
Objetivos particulares	6
Hipótesis	6
1. Antecedentes.....	7
2. Situación actual de los residuos sólidos orgánicos en México	11
2.1 Población y generación	11
2.2 Composición	12
2.3 Gestión integral de residuos sólidos en México.....	13
3. Fundamentos de la fermentación oscura	15
3.1 Procesos biológicos de la digestión anaerobia	15
3.1.1 Hidrólisis	17
3.1.2 Fermentación o acidogénesis	18
3.1.3 Acetogénesis	19
3.1.4 Metanogénesis	21
3.2 Producción de hidrógeno por fermentación oscura.....	21
3.2.1 Tipo de operación del proceso.....	23
3.2.2 Configuración del biorreactor	24
3.2.3 Tratamiento del inóculo.....	24
3.2.4 Tipo de sustrato	26
3.2.5 Temperatura	28
3.2.6 Tamaño de partícula	29
3.2.7 pH.....	29
3.2.8 Tiempo de residencia hidráulica.....	30
3.2.9 Carga orgánica	31
3.3 Fermentación oscura, cambios y perspectivas para la producción a gran escala ...	32
3.3.1 Desarrollo de diferentes tipos de bioreactores y optimización de parámetros ..	33
3.3.2 Procesos de modelado y simulación con dinámica de fluidos computacional ..	34
3.3.3 Uso de materiales de bajo costo	34
3.3.4 Combinación de fermentación oscura, digestión anaerobia y fotofermentación	35
3.3.5 Experiencias de producción biológica de hidrógeno a nivel piloto.....	36
3.4 Fermentación oscura vs digestión anaerobia	38
3.4.1 Proceso industrial de fermentación oscura.....	39
3.4.2 Digestión anaerobia	41
3.4.3 Análisis técnico económico y ambiental	43
4. Metodología	45
4.1 Desarrollo del estado del arte.....	46
4.2 Obtención de los requerimientos para operar un reactor productor de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos	46
4.2.1 Obtención, pretratamiento y caracterización del inóculo	47
4.2.2 Obtención, pretratamiento y caracterización de los residuos sólidos orgánicos	47
4.2.3 Diseño e instalación de un reactor continuo de tanque agitado escala laboratorio	48
4.3 Pruebas preliminares de producción de hidrógeno.....	51
4.3.1 Efecto de los residuos de limón en la producción biológica de hidrógeno	52
4.3.2 Determinación del potencial bioquímico de generación de hidrógeno de los residuos sólidos orgánicos.....	53

4.4 Operación del reactor continuo de tanque agitado productor de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos	54
4.4.1 Arranque del reactor continuo de tanque agitado.....	54
4.4.2 Estrategia de operación en régimen continuo	55
4.5 Técnicas analíticas.....	56
4.5.1 Acondicionamiento de las muestras.....	56
4.5.2 Sólidos totales y sólidos volátiles	57
4.5.3 Demanda Química de Oxígeno.....	57
4.5.4 Cuantificación de carbohidratos	57
4.5.5. Cuantificación de proteínas.....	57
4.5.6 Composición del biogás.....	58
4.5.7 Cuantificación de la composición de AGVs y etanol.....	58
4.5.8 Análisis biológico de comunidades microbianas	59
5. Resultados.....	60
5.1 Caracterización fisicoquímica del inóculo pretratado	60
5.2 Muestreo y caracterización física <i>in situ</i> del sustrato	61
5.3 Caracterización fisicoquímica de los residuos sólidos orgánicos pretratados	62
5.4 Pruebas preliminares de producción de hidrógeno.....	63
5.4.1 Efecto de los residuos de limón sobre la producción de hidrógeno	63
5.4.2 Potencial bioquímico de generación de hidrógeno	66
5.5 Arranque y operación del reactor continuo de tanque agitado productor de hidrógeno	71
5.5.1 Perfil de la tasa de producción, composición y rendimiento de hidrógeno.....	71
5.5.2 Perfil de remoción de sólidos volátiles, demanda química de oxígeno, carbohidratos y proteínas.	74
5.5.3 Perfil de producción de los principales metabolitos de la fermentación oscura	75
5.5.4 Efecto de la carga orgánica sobre la producción de hidrógeno	76
5.5.5 Efecto de la carga orgánica sobre la producción de los principales metabolitos de la fermentación oscura.....	80
5.5.6 Efecto de la carga orgánica sobre la remoción de sólidos totales, sólidos volátiles, demanda química de oxígeno, carbohidratos y proteínas.	82
5.5.7 Análisis de comunidades microbianas	83
6. Conclusiones	86
6.1 Recomendaciones.....	88
Bibliografía.....	90
Anexos	95
Productos derivados de la tesis	98

Índice de figuras

Figura 1. Composición física de los residuos sólidos urbanos en México	13
Figura 2. Gestión integral de residuos sólidos urbanos en México.....	14
Figura 3. Esquema de la biodegradación de la materia orgánica en condiciones anaerobias.....	16
Figura 4. Transición de las esporas inactivas a las formas vegetativas activas.....	25
Figura 5. Efecto del pH en la producción biológica de hidrógeno.....	30
Figura 6. Efecto del tiempo de residencia hidráulica sobre la tasa de producción de hidrógeno.....	31
Figura 7. Digrama de flujo de proceso de la fermentación oscura.....	39
Figura 8. Diagrama de flujo de proceso de la digestión anaerobia	42
Figura 9. Diagrama de la Metodología	45
Figura 10. Diagrama de flujo de proceso de producción de hidrógeno (a) y fotografía del arreglo experimental (b).....	49
Figura 11. Arreglos de los biorreactores por lotes.....	52
Figura 12. Inóculo pretratado	60
Figura 13. Generación y peso volumetrico (PV) de los residuos sólidos orgánicos del restaurante	61
Figura 14. Composición física de los RSO del restaurante	62
Figura 15. Perfil de rendimiento acumulado de hidrógeno a diferentes concentraciones de residuos de limón.....	63
Figura 16. Rendimiento acumulado de hidrógeno en función de la concentración de los residuos de limón.....	64
Figura 17. Metabolitos solubles en función de la concentración de residuos de limón	65
Figura 18. Perfil de rendimiento acumulado (a) y composición de hidrógeno en la prueba de potencial bioquímico de generación de hidrógeno (b).....	67
Figura 19. Perfil de la tasa de producción (a), composición (b) y rendimiento de hidrógeno (C)	72
Figura 20. Perfil de remoción de sólidos volátiles, demanda química de oxígeno (a) carbohidratos y proteínas (b).	75
Figura 21. Perfil de concentración de los ácidos grasos volátiles.....	76
Figura 22. Tasa de producción, rendimiento (a) y composición de hidrógeno en función de la carga orgánica (b).....	77
Figura 23. Producción, distribución de los metabolitos (a) y relación B/A en función de la carga orgánica (b).....	81
Figura 24. DGGE de las muestras durante la operación del reactor continuo de tanque agitado. Perfiles de DGGE para dominio Bacterias (A) y Arqueas(B): Cada carril está relacionado con diferentes días de muestreo.....	84

Índice de tablas

Tabla 1. Población y generación de residuos sólidos urbanos en México	12
Tabla 2. Constantes cinéticas para la hidrólisis anaerobia de carbohidratos, proteínas y lípidos	18
Tabla 3. Reacciones de hidrogenación y deshidrogenación con sus energías libres de Gibbs	19
Tabla 4. Principales reacciones presentes en un reactor durante la fermentación oscura	22
Tabla 5. Condiciones de tratamiento térmico aplicados a diversos inóculos	26
Tabla 6. Producción de hidrógeno en reactores continuos a partir de sustratos puros.....	27
Tabla 7. Producción de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos en reactores en continuos	28
Tabla 8. Efecto de la carga orgánica en la producción de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos en un reactor continuo	32
Tabla 9. Plantas piloto de producción de hidrógeno bajo diferentes estrategias de operación.....	37
Tabla 10. Ventajas y desventajas de la fermentación oscura.....	40
Tabla 11. Ventajas y desventajas de la digestión anaerobia	43
Tabla 12. Aspectos técnicos y económicos de la fermentación oscura y la digestión anaerobia.....	44
Tabla 13. Composición de los aceites esenciales del limón	53
Tabla 14. Estrategia de operación experimental	56
Tabla 15. Caracterización fisicoquímica del inóculo.....	60
Tabla 16. Caracterización física y química de los residuos sólidos orgánicos generados en el restaurante.....	62
Tabla 17. Parámetros de la ecuación de Gompertz modificada para los datos de producción de hidrógeno a diferentes niveles de concentración de residuos de limón.....	64
Tabla 18. Parámetros de operación, remoción y composición de metabolitos a diferentes niveles de concentración de residuos de limón.....	66
Tabla 19: Parámetros cinéticos de la ecuación de Gompertz modificada en la prueba de potencial bioquímico de generación de hidrógeno	67
Tabla 20. Comparación del potencial bioquímico de generación de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos en reactores por lotes	68
Tabla 21: Producción de metabolitos en la prueba de potencial bioquímico de generación de hidrógeno.....	69
Tabla 22. Remoción de sólidos totales, sólidos volátiles, demanda química de oxígeno, carbohidratos y proteínas en la prueba potencial bioquímico de generación de hidrógeno	70
Tabla 23. Comparación de la producción de hidrógeno a diferentes condiciones de operación en reactores continuos	79
Tabla 24. Producción de metabolitos de la fermentación oscura a diferentes niveles de carga orgánica	80
Tabla 25. Parámetros de operación y remoción con diferentes niveles de carga orgánica	82

Abreviaturas

AGVs	Ácidos grasos volátiles
CO	Carga orgánica
CRL	Concentración de los residuos de limón
BES	Bromo sulfanato
CH ₄	Metano
CO ₂	Bióxido de carbono
DA	Digestión anaerobia
DQO	Demanda química de oxígeno
F ₀	Flujo del sustrato en la alimentación
FO	Fermentación oscura
GIRS	Gestión Integral de Residuos Sólidos
H ₂	Hidrógeno
H ₂ S	Sulfuro de hidrógeno
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
LGEEPA	Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente
LPGGIR	Ley general Para la Prevención y Gestión Integral de Residuos
N ₂	Nitrógeno
NH ₃	Amoniaco
NMX	Normas Mexicanas de Referencia
NOM	Normas Oficiales Mexicanas
PH ₂	Producción de hidrógeno
PBH ₂	Producción biológica de hidrógeno
PBGH ₂	Potencial bioquímico de generación de hidrógeno
PH	Producción de hidrógeno
Q	Flujo volumétrico
RCTA	Reactor continuo de tanque agitado
B/A	Relación ácido butírico/ácido acético
H	Rendimiento acumulado de hidrógeno
Hmax	Rendimiento acumulado de hidrógeno máximo
YH	Rendimiento de hidrógeno máximo
YHmax	Rendimiento de hidrógeno
RSO	Residuos sólidos orgánicos
RSU	Residuos sólidos urbanos
S ₀	Concentración del sustrato en la alimentación
SBR	Reactor secuencial por lotes
SEMARNAT	Secretaría de Marina y Recursos Naturales
SF	Sólidos fijos
ST	Sólidos totales
SV	Sólido volátiles
R	Tasa de producción de hidrógeno específica
TPH ₂	Tasa de producción de hidrógeno
TPH _{2max}	Tasa de producción de hidrógeno máxima
D	Tasa de dilución
T	Temperatura
TRH	Tiempo de residencia hidráulica
Λ	Tiempo de latencia
V	Volumen de reactor
ΔG	Energía libre de Gibbs

Resumen

La producción biológica de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos en reactores continuos de tanque agitado ha sido estudiada con diferentes niveles de carga orgánica y se ha determinado que con diferentes niveles de carga orgánica se obtienen diferentes parámetros durante la producción de hidrógeno. Sin embargo, no se ha determinado el efecto de la carga orgánica sobre la producción de hidrógeno.

Esta tesis tuvo como objetivos: conocer el efecto que tiene la carga orgánica sobre la producción biológica de hidrógeno en un reactor continuo a partir de residuos sólidos orgánicos provenientes de un restaurante, evaluar el efecto de la concentración de los residuos de limón sobre la producción biológica de hidrógeno en reactores por lotes y determinar el potencial bioquímico de generación de hidrógeno de los residuos sólidos orgánicos utilizados como sustrato.

Para esto, se estudió la producción de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos con tres niveles de carga orgánica: 19, 38 y 57 gSV/L_{reactor}/d en un reactor continuo de tanque agitado escala laboratorio de 2.3 L a 35°C y 5.5 de pH. Se demostró que la carga orgánica presento efecto sobre la producción de hidrógeno. La producción y rendimiento de hidrógeno presentaron una dependencia cuadrática de la carga orgánica. El aumento de la carga orgánica de forma gradual provocó un descenso en la remoción de demanda química de oxígeno y la remoción de proteínas. La composición de hidrógeno en el biogás no presentó dependencia de la carga orgánica. El rendimiento de hidrógeno máximo de 0.6 mmol H₂/gSV se alcanzó a una carga orgánica de 20.7 gSV/L_{reactor}/d, por otro lado, la tasa de producción de hidrógeno máxima de 19.8 mmol H₂/L_{reactor}/d se consiguió a una carga orgánica de 37.1 gSV/L_{reactor}/d.

Con respecto, al efecto de los residuos de limón sobre la producción de hidrógeno fueron estudiados cuatro niveles de concentración de estos residuos. Fue demostrado, que el rendimiento de hidrógeno máximo acumulado disminuyó de forma lineal con el aumento en la concentración de residuos de limón en el sustrato debido al incremento de los metabolitos totales. Por otro lado, el potencial bioquímico de generación de hidrógeno de los residuos sólidos orgánicos utilizados como sustrato se estudió en reactores por lote y presentó un rendimiento máximo acumulado de 0.67±0.03 mmol H₂/gSV.

Introducción

En los últimos años el crecimiento acelerado de la población ha generado, entre otros, dos problemas: el aumento de la demanda energética y el aumento de los impactos (técnicos, económicos y ambientales) que provoca un mal manejo de los residuos (INEGI, 2015). La producción biológica de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos se presenta como una alternativa de solución sustentable a estos dos problemas (Dung *et al.*, 2014).

El hidrógeno como combustible presenta las siguientes ventajas sobre los combustibles fósiles: es un combustible limpio que no genera emisiones de bióxido de carbono a la atmosfera, tiene el potencial calorífico más alto que cualquiera de los combustibles fósiles (122 KJ/g) (Kapdan and Kargi, 2006), se puede utilizar en celdas de combustible para producir energía eléctrica (Edwards *et al.*, 2009) y se puede producir a partir de fuentes renovables, accesibles y de bajo costo como son aguas residuales y los residuos sólidos orgánicos especialmente residuos de comida (Beneman, 1996 y Liu *et al.*, 2006).

De todos los métodos biológicos para producir hidrógeno el más prometedor y amigable con el ambiente es la fermentación oscura (Bedoya *et al.*, 2008). La fermentación oscura es un proceso biológico en el que microorganismos degradan la materia orgánica en ausencia de oxígeno para producir una mezcla gaseosa llamada biogás, compuesta en su mayoría de hidrógeno y bióxido de carbono, y una mezcla sólida llamada digestato compuesta por ácidos grasos volátiles, alcoholes, carbohidratos, lípidos y proteínas (Pandey, 2013).

Sin embargo, la fermentación oscura es una etapa intermedia de la degradación de la materia orgánica en condiciones anaerobias. La digestión anaerobia se realiza en cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis o fermentación oscura, acetogénesis y metanogénesis. El hidrógeno es un intermediario que se consume en la etapa de metanogénesis (Khalid *et al.*, 2011). Por lo anterior, se hace necesario inhibir los microorganismos metanogénicos para lograr la producción de hidrógeno.

La inhibición de la etapa de metanogénesis es posible por diferentes métodos como el control biocinético (control de la carga orgánica, el tiempo de residencia hidráulica y pH) y

pretratamiento del inóculo (pretratamiento térmico y químico). El pretratamiento térmico es uno de los más utilizados y consiste en inactivar microorganismos metanogénicos y seleccionar microorganismos que producen esporas en condiciones de estrés térmico (Valdez y Poggi, 2009).

Se ha reportado que es posible producir hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos en régimen continuo y en lotes (Ramos *et al.*, 2012; Karlsson *et al.*, 2008). En el caso de la operación en continuo, el reactor continuo de tanque agitado ha sido el más estudiado en largos periodos de operación. Sin embargo, un inconveniente frecuente es la inestabilidad que podría atribuirse a muchas razones incluidas: el arranque del reactor, las características del inóculo y los residuos y las diferentes condiciones de operación como: el pH, la temperatura, el tiempo de residencia hidráulica y (el parámetro que se estudió en esta tesis) la carga orgánica (Bakonyi *et al.*, 2014).

Se ha estudiado la producción de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos en reactores continuos de tanque agitado a diferentes niveles de carga orgánica y se ha encontrado que diferentes cargas orgánicas producen diferentes tasas de producción y rendimientos de hidrógeno (Zahedi *et al.*, 2013; Wang y Zhao, 2009; Ueno *et al.*, 2007). Sin embargo, no se ha determinado la causa de estas diferencias. Por tal motivo, se hace necesario estudiar el efecto de la carga orgánica sobre la producción biológica de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos en reactores continuos de tanque agitado.

Para esto, se desarrolló una metodología en cuatro etapas: En la primera etapa se realizó una investigación sobre el estado del arte de la producción biológica de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos. En la segunda etapa se obtuvieron los requisitos necesarios para operar un reactor continuo de tanque agitado. En esta etapa se diseñó e instaló un reactor continuo productor de hidrógeno escala laboratorio, se obtuvieron y prepararon los residuos sólidos orgánicos y se le dio un pretratamiento al inóculo por el método térmico.

En la tercera etapa se realizaron pruebas preliminares en el laboratorio de producción de hidrógeno en reactores por lotes. En esta etapa, se determinaron el efecto de la concentración de los residuos de limón sobre el rendimiento de hidrógeno y el potencial

bioquímico de generación de hidrógeno de los residuos sólidos orgánicos obtenidos previamente. Por último, en la cuarta etapa se arrancó y operó un reactor continuo de tanque agitado a tres diferentes niveles de carga orgánica: 19, 38 y 57 gSV/L_{reactor}/d. La carga orgánica se controló por medio del flujo de entrada.

El presente trabajo está dividido en 8 capítulos. En el primer capítulo se presentan los antecedentes. En este apartado se exponen trabajos acerca de la producción de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos en reactores por lotes y continuos desde un concepto histórico. En el segundo capítulo se describe el estado del arte de la generación de residuos sólidos urbanos en México. En el tercer capítulo se presentan los fundamentos y el estado del arte de la fermentación oscura.

En el cuarto capítulo se describe la metodología que se realizó para cumplir con los objetivos planteados. En el quinto capítulo se exponen los resultados y los análisis de los mismos, que consistieron en la caracterización fisicoquímica de los residuos sólidos orgánicos en bruto y del inóculo pretratado, la identificación del efecto de la concentración de los residuos de limón sobre el rendimiento acumulado hidrógeno y del potencial bioquímico de generación de hidrógeno de los residuos sólidos orgánicos utilizados como sustrato y la operación de un reactor continuo de tanque agitado productor de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos con tres diferentes niveles de carga orgánica.

En el sexto capítulo se exponen las conclusiones y recomendaciones formuladas a partir de la presente tesis. En el séptimo capítulo se presenta la bibliografía más actualizada referente a la producción de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos vía fermentación oscura, que utilizó para escribir esta tesis. Por último, en el octavo capítulo se presentan los trabajos anexos que básicamente es material suplementario que ayuda a entender con claridad este trabajo. En el noveno capítulo se presentan los productos derivados de la tesis, como son, artículos publicados en revistas indizadas y artículos en extenso para congresos nacionales e internacionales.

Con los resultados de esta tesis se conocerá el efecto de la carga orgánica sobre la producción de hidrógeno. Se propondrán modelos matemáticos que describan el comportamiento de la tasa de producción y rendimiento de hidrógeno en función de la carga orgánica. Por otro lado, se conocerá el potencial bioquímico de generación de

hidrógeno de los residuos sólidos orgánicos y se determinará el efecto que presenta la concentración de los residuos de limón sobre la producción de hidrógeno en reactores por lotes.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto que tiene la carga orgánica sobre la producción biológica de hidrógeno en un reactor continuo a partir de residuos sólidos orgánicos provenientes de un restaurante.

Objetivos particulares

- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los residuos sólidos orgánicos utilizados como sustrato y del lodo granular anaerobio utilizado como inóculo.
- Evaluar el efecto de la concentración de los residuos de limón sobre la producción biológica de hidrógeno en reactores por lotes.
- Determinar el potencial bioquímico de generación de hidrógeno de los residuos sólidos orgánicos utilizados como sustrato en reactores por lotes.
- Evaluar la producción de hidrógeno con diferentes niveles de carga orgánica en un reactor continuo de tanque agitado a partir de residuos sólidos orgánicos provenientes de un restaurante vía fermentación oscura.
- Determinar el valor de carga orgánica en la cual se obtenga el mayor rendimiento y la mayor tasa de producción de hidrógeno.

Hipótesis

La carga orgánica tiene influencia sobre la producción biológica de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos vía fermentación oscura en un reactor continuo.

Existe una cantidad de carga orgánica donde se presenta el máximo rendimiento y la máxima tasa de producción de hidrógeno.

1. Antecedentes

El estudio de la producción de hidrógeno (PH_2) a partir de residuos sólidos orgánicos (RSO) tiene sus orígenes en el estudio de la biodegradación de la materia orgánica por digestión anaerobia (DA) para producir metano (CH_4) (Mata, 2003). Sin embargo, en el año 1996 se propuso un proceso de DA en dos etapas que produzca ambos gases hidrógeno (H_2) y CH_4 con el objetivo de aumentar el rendimiento energético (E) (Beneman, 1996). En la primera etapa de acidogénesis o fermentación se genera H_2 y en la segunda etapa de metanogénesis se genera CH_4 .

En un inicio la producción biológica de hidrógeno (PBH_2) vía fermentación oscura (FO) se investigó en reactores por lotes. En este tipo de reactores se estudió el potencial bioquímico de generación de hidrógeno (PBGH_2) de diferentes tipos de RSO (principalmente de comida y domésticos mezclados e individuales), se optimizaron variables como el pH, la concentración inicial de sólidos volátiles (SV), el pretratamiento del sustrato e inóculo y se acoplaron a reactores anaerobios productores de CH_4 .

Uno de los primeros estudios fue realizado por Okamoto *et al.*, (2000) determinaron el PBGH_2 de siete RSO domésticos individuales tales como la col, la zanahoria y el arroz en reactores por lotes. Encontraron que los carbohidratos produjeron más cantidad de H_2 que los lípidos y las proteínas en la FO. El PBGH_2 de dichos residuos fueron los siguientes: col 1.2–2.7 mmol H_2/gSV , zanahoria 2–3.2 mmol H_2/gSV y arroz, 0.8–4.2 mmol H_2/gSV .

Por su parte Liu *et al.*, (2006) estudiaron el efecto del pH sobre la PBH_2 a partir de RSO en reactores por lotes. Investigaron la producción de H_2 con cinco diferentes niveles de pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, reportaron que el rendimiento acumulado de hidrógeno máximo (H_{max}) fue obtenido a un pH óptimo de 5.5.

Más tarde, Kim *et al.*, (2009) estudiaron el efecto de tres pretratamientos al sustrato: térmico (90°C por 20 min), ácido (pH 1 por un día) y alcalino (pH 11 por un día) sobre la PBH_2 a partir de RSO. De los tres métodos, el pretratamiento térmico es el que mejor rendimiento acumulado de hidrógeno (H) presentó. Las bacterias que formaron el ácido láctico fueron las especies más abundantes en los RSO sin pretratamiento y las bacterias que formaron el H_2 fueron las especies más abundantes en los RSO con pretratamiento.

Cuando la temperatura fue incrementada en el pretratamiento térmico la producción de ácido láctico fue suprimida y aumentó el H₂.

Después, la PBH₂ a partir de RSO vía FO fue estudiada en reactores semi-continuos y reactores continuos. Dentro los reactores continuos el más estudiado fue el reactor continuo de tanque agitado (RCTA). Sin embargo, las primeras investigaciones sobre la producción de H₂ en este tipo de reactores se enfocaron únicamente a mantener las condiciones para producir H₂ de forma estable (Liu *et al.*, 2006).

Hasta que Jo *et al.*, (2006) estudiaron la estructura de las comunidades microbianas durante la PBH₂ inestable en un RCTA. Encontraron que hubo un cambio en la comunidad microbiana de *Clostridium* spp. productora de H₂ a *Lactobacillus* spp. productora de ácido acético. La baja tasa de producción de hidrogeno (TPH₂) fue relacionada con la temperatura (25°C) de almacenamiento de los RSO. Después que se controló la temperatura de los RSO en la alimentación a 4°C no hubo cambios significativos en las comunidades microbianas y TPH₂ se mantuvo estable por un largo periodo.

Por otro lado; Onishi *et al.*, (2005) y Liu *et al.*, (2006) demostraron que no es necesario el tradicional pretratamiento térmico para inóculos mixtos en la producción de H₂ para inactivar arqueas metanogénicas. Liu *et al.*, (2006) operaron un RCTA durante 70 días sin dar un pretratamiento al inóculo bajo las siguientes condiciones de operación: 7.5% de SV, 37 °C, 5.5 de pH y 37.5 gSV/L_{reactor}/d de carga orgánica (CO). La producción media fue de 71 mmol H₂/L_{reactor}/d.

Antonopolou *et al.*, (2008) estudiaron el efecto del tiempo de residencia hidráulico (TRH) en la PBH₂ a partir de residuos de sorgo dulce. Evaluaron la PH₂ con cinco niveles de TRH (4, 6, 8, 12, 24 h) y encontraron que la TPH₂ fue inversamente proporcional al TRH. Por otro lado, Zahedi *et al.*, (2014) utilizaron RSO de comida como sustrato y encontraron el mismo comportamiento en un rango de TRH de 12 h a 240 h. Sin embargo, cuando fue disminuido el TRH de 12 a 6 horas la TPH₂ disminuyó.

Más adelante, Koutroli *et al.*, (2009) estudiaron la PBH₂ a partir de RSO de pulpa de oliva a dos temperaturas: mesofílica 35°C y termofílica 55 °C. Las condiciones de operación fueron las siguientes: 5.5 de pH, 30 h de TRH y 37.8 gSV/L_{reactor}/d de CO. Encontraron

que el aumento de la temperatura de 35 a 55°C provocó el aumento de la TPH_2 de 12 a 177 $\text{mmol H}_2/\text{L}_{\text{reactor}}/\text{d}$ y el aumento del rendimiento de hidrógeno (YH) de 0.19 a 0.32 $\text{mmol H}_2/\text{gSV}$.

En un estudio realizado por Pakarinen *et al.*, (2011) se probó que fue posible cambiar el proceso metanogénico por el de PH_2 a partir de RSO en un reactor continuo, con el aumento de la CO y la disminución del TRH. En este trabajo la CO fue aumentada de 2 a 10 $\text{gSV}/\text{L}_{\text{reactor}}/\text{d}$ y al mismo tiempo el TRH fue disminuido de 30 a 6 días, con esto, lograron cambiar el proceso metanogénico hacia el proceso de producción de H_2 .

Por su cuenta Wang y Zhao, (2009) en un reactor continuo estudiaron la PBH_2 a partir de RSO con diferentes niveles de CO. Obtuvieron que al aumentar la CO de 15 a 38 $\text{gSV}/\text{L}_{\text{reactor}}/\text{d}$ la TPH_2 aumentó y el rendimiento de H_2 disminuyó. Por otro lado, Zahedi *et al.*, (2014) encontraron que al aumentar la CO de 110 a 220 $\text{gSV}/\text{L}_{\text{reactor}}/\text{d}$ la TPH_2 disminuyó.

Considerando que el primer trabajo se encuentra en un rango de CO de 15 a 38 $\text{gSV}/\text{L}_{\text{reactor}}/\text{d}$ y el segundo en un rango de CO entre 110 a 220 $\text{gSV}/\text{L}_{\text{reactor}}/\text{d}$ estos resultados pueden ser complementarios. Sin embargo, es necesario explorar la PH_2 en un rango de CO de 15 a 220 $\text{gSV}/\text{L}_{\text{reactor}}/\text{d}$ para conocer el efecto de la CO sobre la PBH_2 .

Por su parte, el grupo de trabajo de la Unidad Académica Juriquilla (UAJ) del Instituto de Ingeniería de la UNAM, desde el año 2010 hasta la fecha comenzó la investigación sobre la PH_2 a partir de la biodegradación de RSO vía FO en diferentes tipos de reactores. Su principal objetivo fue determinar los parámetros con los cuales se obtenga la mayor PH_2 a partir de RSO en biorreactores fermentativos.

La contribución del presente trabajo para cumplir con este objetivo fue estudiar la PBH_2 en un RCTA a partir de RSO y determinar un rango de CO donde se maximice la TPH_2 y el YH. También con este estudio se obtendrá un modelo matemático que describa el comportamiento de la TPH_2 y el YH en función de la CO.

El primer trabajo fue realizado por Moreno y Buitrón, (2011), analizaron la influencia del tamaño de partícula en la PBH_2 en condiciones mesofílicas y en un reactor por lotes. Con

este estudio demostraron que existe un efecto del tamaño de partícula y la concentración inicial de sólidos totales (ST) en la PH_2 . También encontraron que en partículas mayores a 2 mm, la PH_2 aumentó con el incremento de la concentración inicial de ST y para partículas menores a 2 mm existe un rango de concentración de ST donde se inhibe la PH_2 .

Por su parte Ramos *et al.*, (2012) estudiaron la influencia que tiene la concentración de SV y el pH inicial en la biodegradación de RSO provenientes de una cafetería en reactores por lotes y en condiciones mesofílicas. Determinaron que el rendimiento y la TPH_2 están influenciados por el pH inicial y la concentración de sólidos. El más alto H de 2.9 mmol H_2 /d fue obtenida a 90 g ST/L y un pH de 5.5.

Por último, Bújanos y Moreno, (2013) evaluaron el efecto del TRH en un reactor discontinuo secuencial (SBR por sus siglas en inglés) para producir H_2 alimentado con RSO de una cafetería. Con este estudio determinaron que el mayor porcentaje de H_2 en el biogás y la mayor TPH_2 fueron obtenidas a un TRH de 24 h.

2. Situación actual de los residuos sólidos orgánicos en México

En el año 2010 México contaba con una población de 117 millones de habitantes que generó 42.2 millones de toneladas de residuos sólidos urbanos (RSU) por lo que la generación per cápita promedio fue de 0.99 kg/hab/d. Se conoce que más del 95% de dichos RSU llegaron a sitios de disposición final sin tratamiento o separación de algún tipo (INEGI, 2013).

En su mayor parte los sitios de disposición final con los que cuenta país no disponen de instalaciones adecuadas, además de no cumplir con los requisitos que exige la Norma Oficial Mexicana NOM-083-SEMARNAT-2003 referente a los lineamientos que debe cumplir un sitio de disposición final.

La composición de los RSU que llegan a sitios de disposición final es aproximadamente de 51% de residuos orgánicos (en su mayor parte residuos de comida y jardinería) y 49% de inorgánicos (INEGI, 2013).

Los RSO al estar expuestos sin un control adecuado en sitios que no cumplen con los lineamientos que debe cumplir un sitio de disposición final, como es el caso de los tiraderos a cielo abierto, causan diferentes impactos ambientales como son la generación de gases de efecto invernadero, generación de lixiviados que contaminan los mantos acuíferos, atracción de fauna nociva portadora de enfermedades que afectan a la población, entre otros (Jiménez, 2001).

Con base en lo anterior, existe un gran potencial para utilizar los RSO que se generan en México como materia prima en la PBH₂ por FO y de esta forma mitigar los problemas que causa el mal manejo de estos. Enseguida se mostrará la situación actual de los RSO en México.

2.1 Población y generación

La generación “*es la acción de producir RSU a través del desarrollo de procesos productivos o de consumo*” (DOF, 2003). Ésta varía de acuerdo con la modificación de los patrones de consumo de la población y depende esencialmente de los siguientes factores:

tamaño de la población de generadores, nivel de vida de la población, hábitos de consumo de la población, estación del año, día de la semana, costumbres de los habitantes y zona geográfica donde se habita (Runfola y Gallardo, 2009).

Con base en la tabla 1, en México desde el año 2000 hasta el año 2012 la población aumento de 98 millones a 116 millones de habitantes (aproximadamente 20%); del mismo modo la generación de RSO tuvo un crecimiento de 31 a 42 millones de t/a de RSU (37%) y la generación per cápita mostro un incremento de 0.86 a 0.99 kg/hab/d (14%).

Tabla 1. Población y generación de residuos sólidos urbanos en México

Año	Población (millones de hab)	RSU (millones de t/a)	GPC (kg/hab/día)
2000	97.5	30.7	0.86
2005	103.3	35.4	0.94
2010	112.3	40.1	0.98
2012	116.8	42.2	0.99

Fuente: Adaptada del INEGI, 2013

2.2 Composición

La composición de los residuos sólidos municipales es un espejo de los patrones de consumo, hábitos alimenticios, estructura social entre otros factores de las sociedades (Runfola y Gallardo, 2009) y es una de las propiedades más importante para desarrollar planes adecuados de manejo.

Históricamente los residuos sólidos urbanos en México han estado compuestos aproximadamente de 52% de orgánicos (principalmente restos de jardinería y alimentos) y 48% de inorgánicos (principalmente de residuos de textiles papel, plástico, vidrio, metales y otros materiales no reciclables) (ver figura 1).

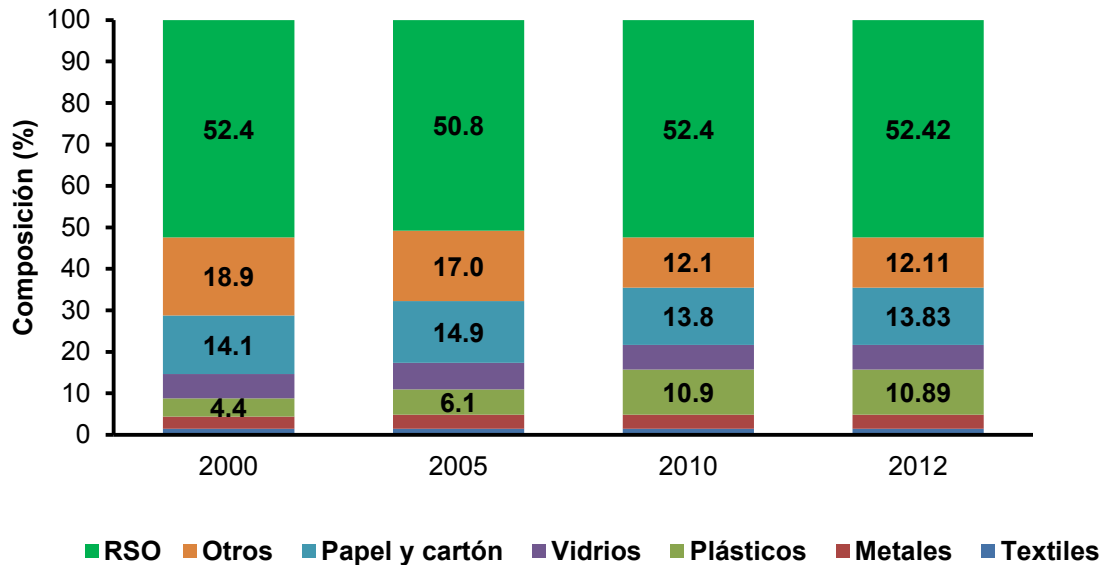


Figura 1. Composición física de los residuos sólidos urbanos en México

Fuente: Adaptada del INEGI, 2013

2.3 Gestión integral de residuos sólidos en México.

La LGPGIR (2003) define la Gestión Integral de Residuos como: “*Conjunto articulado e interrelacionado de acciones normativas, operativas, financieras, de planeación, administrativas, sociales, educativas, de monitoreo, supervisión y evaluación, para el manejo de residuos, desde su generación hasta la disposición final, a fin de lograr beneficios ambientales, la optimización económica de su manejo y su aceptación social, respondiendo a las necesidades y circunstancias de cada localidad o región*” (DOF, 2003).

En México la gestión integral de RSU comprende las etapas siguientes:

- Generación,
- Almacenamiento,
- Recolección,
- Transporte,
- Transferencia (solo cuando el sitio de disposición final está muy lejos de la ruta de recolección del camión recolector),
- Aprovechamiento y
- Disposición final.

En la figura 2 se presentan datos sobre la gestión integral de residuos sólidos urbanos desde al año 2000 hasta el año 2012. Históricamente del total de RSU que se generan en México más del 95% llegan a sitios de disposición como: rellenos sanitarios 65% (sitios que cuentan parcialmente con aplicación y vigilancia de las medidas necesarias para el cumplimiento de las disposiciones establecidas) rellenos de tierra controlados 8% (sitios para la disposición final de los residuos sólidos que no cuentan con la infraestructura propia de un relleno sanitario, pero donde se dan las condiciones mínimas para la compactación y cobertura diaria), tiraderos a cielo abierto 22% y solo 5% se envía a reciclaje (INEGI, 2013).

Con base en la gráfica de la figura 2, la cantidad de RSU que llegan a sitios de disposición final, en los últimos años ha incrementado de 55% a 83% y los que llegan a tiraderos a cielo abierto han disminuido de 42 a 23%, mientras que los RSU que se envían a reciclaje han aumentado de 2 a 5%.

La gestión integral de residuos sólidos urbanos en México durante la etapa de aprovechamiento no presenta tratamiento y recuperación energética de ningún tipo, lo cual provoca que más del 95% de los RSU generados lleguen a sitios de disposición final como son rellenos sanitarios y tiraderos a cielo abierto sin separación o tratamiento (INEGI, 2013).

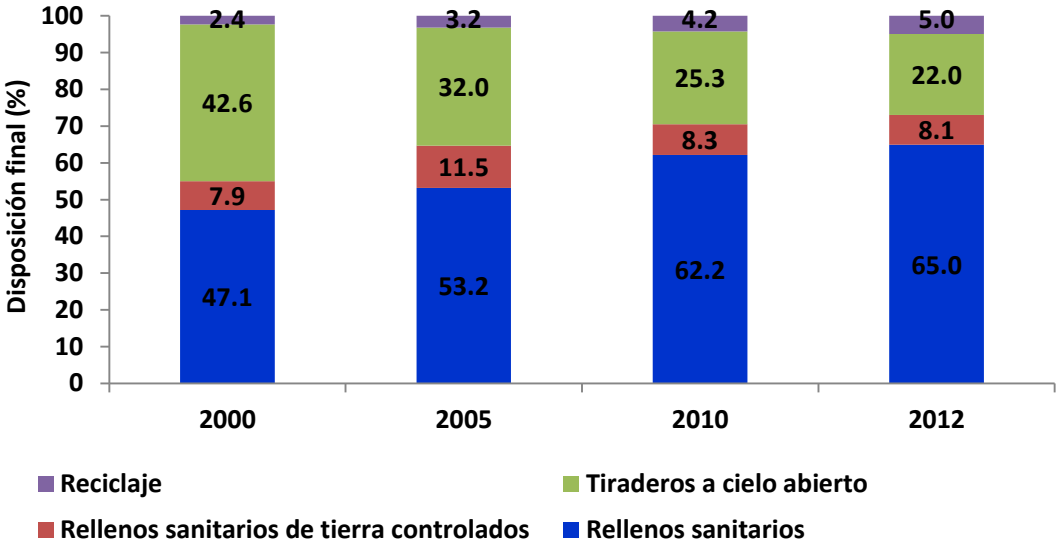


Figura 2. Gestión integral de residuos sólidos urbanos en México

Fuente: Adaptada de INEGI, 2013

3. Fundamentos de la fermentación oscura

Dentro de todos los métodos para producir H_2 el más prometedor, viable y amigable con el ambiente es la FO (Dung *et al.*, 2014). La FO es un proceso biológico donde los RSO son degradados por consorcios microbianos en ausencia de oxígeno para producir una mezcla gaseosa llamada biogás compuesta de H_2 y CO_2 y un digestato compuesto con altas concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGVs), alcoholes y cetonas (Kapdan y Kargi, 2006). A este proceso se le llama FO para diferenciarlo de la fotofermentación, el cual es un proceso que requiere la presencia de luz (Pandey *et al.*, 2013).

Sin embargo, la FO es una etapa intermedia de la degradación de la materia orgánica en condiciones anaerobias la cual se desarrolla, como ya se dijo en cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis o fermentación, acetogénesis y metanogénesis. La metanogénesis es determinante, puesto que en esta etapa se consume el H_2 producido en la fermentación para producir CH_4 . Por lo anterior, es necesario buscar métodos para inhibir la etapa de metanogénesis, pues es vital la desaparición de ésta para poder producir H_2 (Valdez y Poggi, 2009).

La PBH_2 por FO a partir de RSO en RCTA se ha estudiado principalmente a nivel laboratorio (Ren *et al.*, 2011; Bedoya *et al.*, 2008). Se ha encontrado que este proceso entre otros tiene influencia del pH, TRH, CO, temperatura, tipo de inóculo y pretratamiento del inóculo (Liu *et al.*, 2006; Antonopolou *et al.*, 2008; Koutroli *et al.*, 2009; Zahedi *et al.*, 2014).

En las siguientes secciones de este capítulo, se revisarán a detalle los procesos microbiológicos de la PBH_2 mediante degradación de la materia orgánica vía FO y se presentaran los principales parámetros que afectan la PBH_2 .

3.1 Procesos biológicos de la digestión anaerobia

Cuando los RSO se mantienen en un ambiente con ausencia de oxígeno, bacterias anaerobias especializadas se desarrollan y utilizan el exceso de materia orgánica para sus procesos metabólicos. Los productos finales son principalmente CH_4 y CO_2 (Mata, 2003).

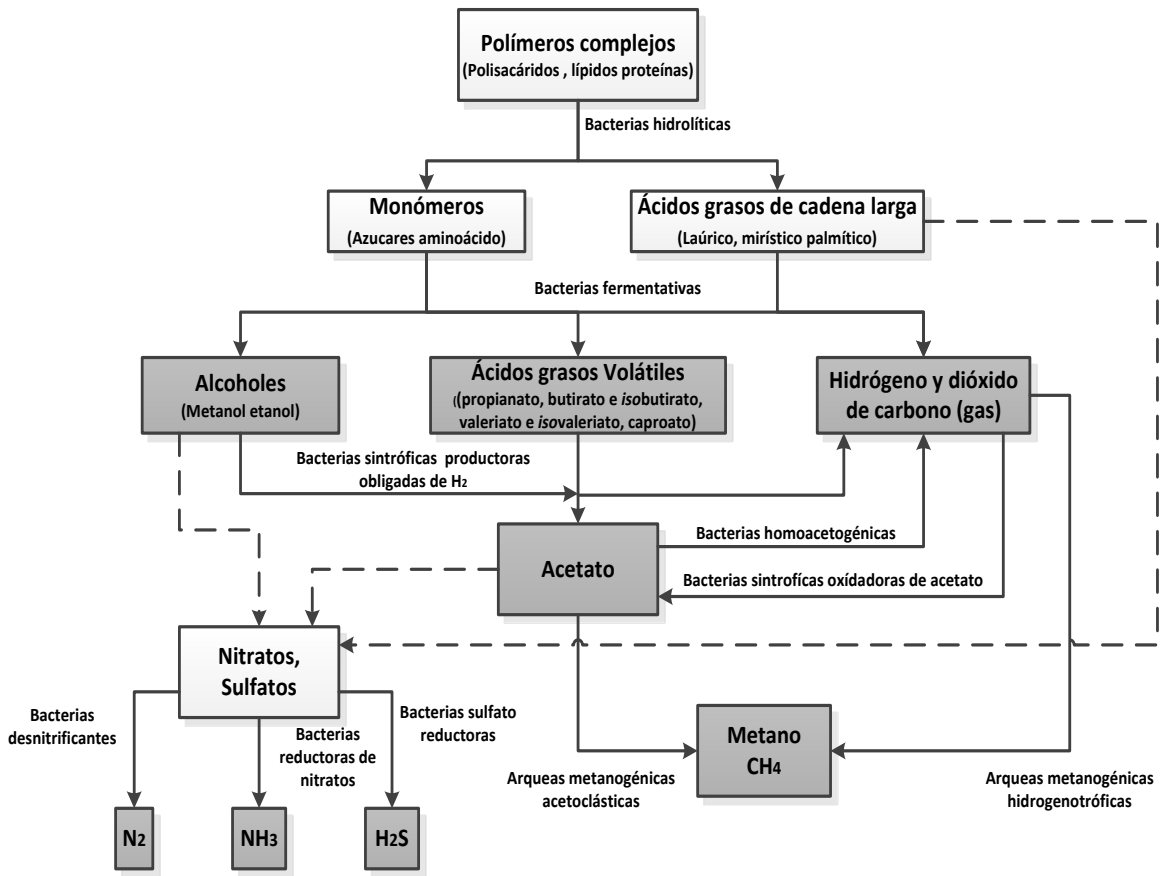


Figura 3. Esquema de la biodegradación de la materia orgánica en condiciones anaerobias

Fuente: Adaptada de Almeida *et al.*, 2011 y Gerardi, 2003

Durante la biodegradación de RSO vía Digestión anaerobia, un número de microorganismos trabajan en secuencia, los productos de un grupo sirve de sustrato a otro. Un grupo es responsable de la hidrólisis de polímeros orgánicos, un segundo grupo de bacterias anaerobias fermentan los productos del primer grupo a simples ácidos orgánicos. Finalmente un tercer grupo de microorganismos utiliza H_2 y ácido acético para formar CH_4 y CO_2 (ver figura 3) (Almeida *et al.*, 2011: Gerardi, 2003).

A continuación se hará una descripción más detallada de las etapas que componen el proceso de degradación de la materia orgánica vía digestión anaerobia.

3.1.1 Hidrólisis

La primera etapa de la digestión anaerobia es la degradación de los polímeros naturales como las proteínas, carbohidratos lípidos por bacterias hidrolíticas en sus correspondientes monómeros como son péptidos, sacáridos y ácidos grasos (GIZ, 2012). Esta etapa es algunas veces limitante en el funcionamiento de un digestor anaerobio, ya que a través de la hidrólisis las partículas complejas son solubilizadas para hacerlas más accesibles al interior de la membrana celular de los microorganismos (Khalid *et al.*, 2011).

La hidrólisis se define como la solubilización de partículas o coloides insolubles que incluye la descomposición biológica de polímeros orgánicos y dímeros, los cuales son capaces de atravesar la membrana celular. La hidrólisis de polímeros es realizada regularmente por enzimas extracelulares (*hidrolasas*) las cuales se encargan de romper enlaces específicos con ayuda de la molécula del agua para obtener dímeros o monómeros que son moléculas más pequeñas (Reith y Wijffels, 2003).

Dicho proceso ha sido descrito por Mata, (2003) como una cinética de primer orden (ver ecuación 1):

$$r_s = K_h * S \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde r_s es la velocidad de consumo de sustrato, S es la concentración del sustrato y K_h es la constante de hidrólisis.

La solubilización de sustratos insolubles es un proceso complejo que depende de diferentes parámetros tales como el tamaño de partícula, el pH, la temperatura, producción de enzimas, la adsorción y difusión de enzimas a la partícula. Se han reportado un gran número de constantes concernientes a la degradación de carbohidratos, proteínas y lípidos asumiendo cinéticas de primer orden, tal como se presenta en la tabla 2 (Almeida *et al.*, 2011).

La constante cinética de primer orden es una medida de la velocidad de hidrólisis de los polímeros naturales, entre mayor sea esta constante mayor es la velocidad de hidrólisis de estos polímeros. En general, la velocidad de hidrólisis de los carbohidratos es mayor

que la velocidad de hidrólisis de las proteínas y la velocidad de hidrólisis de los lípidos es más baja que la velocidad de hidrólisis de las proteínas (ver tabla 2).

Tabla 2. Constantes cinéticas para la hidrólisis anaerobia de carbohidratos, proteínas y lípidos

Sustrato	Constante cinética (1/d)
Carbohidratos	0.025-0.200
Proteínas	0.015-0.075
Lípidos	0.005-0.010

Fuente: Adaptada de Almeida *et al.*, 2011

La importancia de este tipo de bacterias radica en la velocidad con la que solubilizan la materia orgánica particulada y se ha comprobado que dicha velocidad de hidrólisis del sustrato depende tanto del tipo, origen y previa adaptación del inóculo y a su vez la naturaleza del sustrato determina el tipo y grado de bacterias hidrolíticas presentes (Khalid *et al.*, 2011).

Los principales componentes de la biomasa alimentada a un digestor anaerobio son la celulosa, hemicelulosa y lignina, que son polímeros distribuidos en una matriz lignoceluloica (Lo *et al.*, 2008). Se conocen como celulasas al conjunto de enzimas encargadas de la hidrólisis de la celulosa los tres principales tipos de celulasas son conocidas como: endocelulasas, exocelulasas y las celobisas (Ohnishi *et al.*, 2010).

3.1.2 Fermentación o acidogénesis

Durante la etapa de fermentación el material orgánico soluble, proveniente de la hidrólisis es convertido principalmente en acetato, ácidos grasos de cadena corta, alcoholes, H₂ y CO₂ (Mata, 2003). Bacterias anaerobias obligadas y facultativas son las principales que llevan a cabo la fermentación del sustrato. Estas bacterias utilizan en un inicio las rutas catabólicas de polisacáridos, aminoácidos y el glicerol para producir glucosa, posteriormente esta glucosa es transformada vía glucolisis en piruvato para seguir las rutas de la fermentación alcohólica, láctica y acética (Valdez y Poggi, 2009; Bedoya, 2008).

Algunos de los microorganismos fermentativos predominantes en los biodigestores anaerobios son: *Eubacterium cellulosolvens*, *Clostridium cellulosolvens*, *Clostridium celluvorans*, *Clostridium thermocellun* y *Bacteroides cellusolvens* entre otras (Almeida *et al.*, 2011).

Los ácidos grasos volátiles (AGVs) son uno de los principales productos de la fermentación de carbohidratos en digestores. El metabolismo de los microorganismos que degradan carbohidratos puede verse afectado por la presión parcial de H₂ derivado de la misma fermentación, inclusive afectar a la posterior oxidación de los ácidos orgánicos producidos en acetato. La acumulación de AGVs conlleva a la disminución del pH en el sistema, dicha caída de pH afecta la metanogénesis y la fermentación (Bedoya *et al.*, 2007; Valdez y Poggi, 2009).

3.1.3 Acetogénesis

Durante la tercera etapa de la digestión anaerobia, la acetogénesis, el ácido acético es producido por dos rutas metabólicas, la acetogénesis por hidrogenación y la acetogénesis por deshidrogenación. En la tabla 3, por un lado, se presentan las principales reacciones de deshidrogenación de los alcoholes primarios (ecuación 2) y los ácidos grasos (ecuación 3, 4 y 5), por otro lado, se muestran las principales reacciones de hidrogenación (ecuación 6 y 7) que se presentan en la DA.

Tabla 3. Reacciones de hidrogenación y deshidrogenación con sus energías libres de Gibbs

Reacción	ΔG (kJ/mol)	Ecuación
Reacciones de deshidrogenación		
• Alcoholes primarios		
$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2H_2$	9.6	2
• Ácidos grasos		
$CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2H_2$	48.3	3
$CH_3CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + 3H_2$	76.0	4
$CH_3COOH + 2H_2O \rightarrow 2CO_2 + 4H_2$	94.9	5
Reacciones de hidrogenación		
$4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O$	-94.9	6
$H_2 + S^0 \rightarrow H_2S$	-33.9	7

Fuente: Adaptada de Mata, 2003

Acetogénesis por deshidrogenación: bacterias sintróficas

Generalmente en la digestión anaerobia la etapa de acetogénesis suele referirse a la acetogénesis por deshidrogenación, y específicamente, a la oxidación anaerobia de ácidos grasos de cadena larga y corta (ver tabla 3). Las bacterias encargadas de esta vía son las conocidas como bacterias reductoras obligadas de protones o productoras obligadas de H₂ (Almeida *et al.*, 2011).

Elas son inhibidas inclusive por una pequeña presión parcial de H₂, por lo cual sólo pueden sobrevivir en asociaciones sintróficas con microorganismos que consumen H₂, como las arqueas metanogénicas acetoclásticas e hidrogenotróficas, bacterias homoacetogénicas y bacterias sulfato reductoras (Valdez y Poggi, 2009).

La sintrofia es un caso especial de cooperación simbiótica entre dos tipos de microorganismos metabólicamente diferentes, los cuales dependen el uno del otro para la degradación de un cierto sustrato, la mayoría de las veces por razones de conservación de energía (Gerardi, 2003).

Dicho término fue acuñado para describir la cercana relación simbiótica de las bacterias fermentadoras oxidadoras de ácidos grasos con arqueas metanogénicas oxidadoras de H₂, bacterias fermentadoras oxidadoras de alcoholes y también se pueden encontrar bacterias oxidadoras de compuestos aromáticos y aminoácidos (Almeida *et al.*, 2011).

➤ **Acetogénesis por hidrogenación: bacterias homoacéticas**

La acetogénesis por hidrogenación es el mecanismo por el cual se produce acetato como único producto final de la reducción del dióxido de carbono más H₂, debido a su analogía con la homofermentación láctica, esta vía también es conocida como homoacetogénesis.

La ruta de fijación del CO₂ a acetato, donde se utiliza H₂ como donador de electrones, es llamada Wood-Ljungdahl, también “ruta del acetyl CoA” o la “ruta del monóxido de carbono deshidrogenasa” (Valdez y Poggi, 2003). Este proceso se representa por la reacción química de la ecuación 6 (ver tabla 3). Algunas de las bacterias homoacetogénicas que han sido mayor estudiadas entre otras están: *Clostridium thermoaceticum*,

Acetobacterium woodii, *Clostridium formicoaceticum*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium thermoautotrophicum*, y *Acetogenium kivui* (Almeida *et al.*, 2011).

3.1.4 Metanogénesis

La metanogénesis es la etapa final de la digestión anaerobia. Ésta consiste en la formación de CH₄ a partir de dos rutas principales: metanogénesis acetoclástica y metanogénesis hidrogenotrófica. Las arqueas metanogénicas se pueden dividir en dos subgrupos dependiendo del sustrato que emplean para producir CH₄ en arqueas metanogénicas acetoclásticas y arqueas metanogénicas hidrogenotróficas (Mata, 2003).

Las arqueas metanogénicas acetoclásticas catalizan la reacción de reducción del ácido acético para producir CH₄ y CO₂. Existen fundamentalmente dos géneros de estas arqueas: *Methanosarcina*, y *Methanosaeta*. La ecuación 8 representa el proceso químico de la metanogénesis acetoclástica (Almeida *et al.*, 2011).



Por su parte, las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas catalizan la reacción entre el H₂ y el CO₂ para producir CH₄. Los principales géneros pertenecientes a este subgrupo son: *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanobrevibacterium*, *Methanospirillum* y *Methanoplanus*. La ecuación 9 representa el proceso químico de la metanogénesis hidrogenotrófica.



3.2 Producción de hidrógeno por fermentación oscura

La PBH₂ por medio de la FO es una etapa intermedia de la degradación natural de la materia orgánica por digestión anaerobia (Khalid *et al.*, 2011). Por lo tanto, para producir H₂ vía FO es necesario favorecer las etapas y los microorganismos que generan el H₂ y por otro lado inhibir las que lo consuman (Valdez y Poggi, 2009).

La producción de H₂ se da principalmente en la etapa de fermentación de monosacáridos (por bacterias fermentativas) y en la etapa de acetogénesis por oxidación de ácidos grasos (por bacterias homoacetogénicas). El H₂ que se produce en estos procesos es consumido principalmente en la etapa de metanogénesis (por arqueas metanogénicas, bacterias sulfatorreductoras y nitrorreductoras) y en la etapa de acetogénesis (por bacterias simbióticas oxidadoras de acetato) (Valdez y Poggi, 2009).

Tal como se muestra en la tabla 4, las principales reacciones que se llevan a cabo durante la producción de H₂ a partir de RSO son las de formación del ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y etanol por fermentación de la glucosa y la de formación de ácido acético por la ruta homoacetogénica (Pandey *et al.*, 2013; Motte *et al.*, 2013).

Tabla 4. Principales reacciones presentes en un reactor durante la fermentación oscura

Ruta metabólica	Fermentación	Reacción	Ecuación
PH	De glucosa	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$	10
PH	De glucosa	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$	11
PH	De ácido propiónico	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$	12
CH	Homoacetogénica	$2CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O$	13
Otros	De glucosa	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2OH + CO_2$	14

Fuente: adaptada de Pandey *et al.*, 2013; Motte *et al.*, 2013

Nota: PH₂: Producción de hidrógeno, CH: consumo de hidrógeno

La producción de H₂ a partir de RSO en reactores continuos tiene influencia de las siguientes variables de proceso: pH, TRH y presión parcial del gas. La formación de los productos obedece a las condiciones ambientales en las cuales los microorganismos crecen. Productos como etanol, butanol y lactato, contienen H₂ que todavía no se ha liberado; así, para maximizar la cantidad de H₂, el metabolismo de la bacteria debe enfocarse hacia la producción de ácidos grasos volátiles (AGVs) (Liu *et al.*, 2006; Antonopolou *et al.*, 2008; Koutroli *et al.*, 2009; Zahedi *et al.*, 2014; Pakarinen *et al.*, 2009).

A continuación se presentará una descripción de los factores que afectan la PBH₂ en reactores continuos y en lotes.

3.2.1 Tipo de operación del proceso

La producción de H₂ por FO se puede llevar a cabo en operación por lotes o intermitente, continuo y semicontinuo. Antes de desarrollar el balance de materia y energía y balance de electrones es necesario reconocer a qué tipo de categorías pertenece (Felder y Rousseau, 2006). Enseguida se describen cada uno de estos procesos.

- **Proceso intermitente o por lotes:** el sustrato, el inóculo y los nutrientes requeridos se alimentan al biorreactor al inicio del proceso y trascurrido un tiempo se produce biogás compuesto en su mayoría de H₂ y CO₂ .y un digestato sólido que son retirados del reactor.
- **Proceso continuo;** opera en estado estacionario es decir sus variables de entrada y salida no dependen del tiempo. En un biorreactor productor de H₂ la composición de sustrato, el pH, el TRH, la CO, la TPH₂, el YH, la composición de sustrato y los flujos tanto de entrada como de salida no cambian con el tiempo.
- **Proceso semicontinuo;** la alimentación o descarga se llevan de forma periódica. Un proceso semicontinuo de FO consiste en introducir materia orgánica, el inóculo y los nutrientes en cargas dosificadas en intervalos de tiempo, así como extraer el biogás y el digestato de forma espontánea.

Los procesos por lotes se utilizan con mayor frecuencia en condiciones de laboratorio, donde se estudia principalmente los rendimientos de un determinado sustrato, para acondicionamiento del inóculo antes de la fermentación, para conocer los requerimientos nutricionales de una cepa, para realizar cinéticas de crecimiento poblacional de los microorganismos y para conocer condiciones de operación óptimas (Lay *et al.*, 2012).

Aunque todavía no se tiene un proceso continuo económicamente factible, en los últimos años se han realizado varios trabajos donde se estudia el efecto de los principales parámetros que afectan la producción de hidrógeno. Se han realizado estudios en reactores continuos con diferentes cultivos (mesofílicos y termofílicos) con gran diversidad de condiciones (ver tabla 6 y 7).

3.2.2 Configuración del biorreactor

Las configuraciones más utilizadas para la PBH₂ por FO son el reactor por lotes, el RCTA y el SBR y menos explorado pero prometedor para mejorar los rendimientos y altas cargas orgánicas son los reactores de flujo pistón (PBR por sus siglas en ingles).

➤ Reactores por lotes

En este tipo de reactores el sustrato y los nutrientes son alimentados al inicio del proceso después de un cierto tiempo se extraen los productos.

Este tipo de reactores se han utilizado más en el laboratorio para estudiar entre otros aspectos cinéticas de crecimiento microbiano, efecto y optimización de variables de procesos en la PBH₂ por FO. Generalmente se utilizan botes de 0.1 L hasta 3 L (Ramos *et al.*, 2012; Moreno y Buitrón, 2011).

➤ Reactores continuos de tanque agitado (RCTA)

Son tanques cilíndricos herméticos en los que el sustrato es mezclado de manera regular y de manera no violenta mediante agitadores. En estos reactores los agitadores mantienen el régimen de mezcla completa, permitiendo que el sustrato que ingresa entre en contacto con la población bacteriana y con el sustrato en degradación (Lay *et al.*, 2012). En comparación con otro tipo de reactores continuos el TRH es más alto, debido a que la concentración de cualquier especie en el reactor es la misma que en el efluente.

Esta configuración, es el principal tipo de reactor empleado para la producción de H₂ por FO, sus principales característica son que la biomasa se encuentra suspendida, el TRH es igual al tiempo de retención celular lo que se puede utilizar para lavar las arqueas metanogénicas dentro del reactor y seleccionar bacterias fermentativas (Zhu *et al.*, 2008).

3.2.3 Tratamiento del inóculo

Algunas especies microbianas tienen la capacidad de esporular cuando se encuentran en condiciones de estrés, lo cual se puede manifestar mediante un choque térmico, un

cambio de los nutrientes y por la presencia de compuestos químicos inhibidores. Las esporas son altamente resistentes al calor, a la radiación, pH extremos y compuestos tóxicos (Valdez y Poggi, 2009).

Estas características son utilizadas por diferentes autores para inhibir o matar bacterias que no forman esporas como las arqueas metanogénicas por tratamiento del inóculo con choques térmicos, cambio de nutrientes o adición de compuestos químicos tóxicos. La transición de las esporas inactivas a formas vegetativas activas se puede dividir en tres fases: la activación, la germinación y el crecimiento como se presenta en la figura 4.

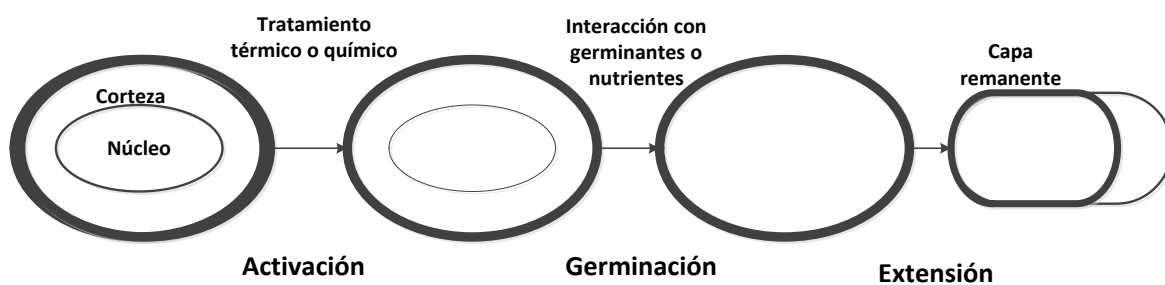


Figura 4. Transición de las esporas inactivas a las formas vegetativas activas.

Fuente: Adaptada de Valdez y Poggi, 2009

➤ **Pretratamiento térmico**

El pretratamiento por choques térmicos elimina las arqueas metanogénicas por una aplicación de calor al inóculo típicamente a 100°C durante 24 horas, también selecciona simultáneamente las esporas de bacterias acidogénicas que germinan, produciendo H₂ cuando las condiciones son favorables para el crecimiento (Valdez y Poggi, 2009; Bujanos y Moreno, 2013; Ramos *et al.*, 2012).

La variabilidad natural de los cultivos de bacterias, aunado a los complejos mecanismos biológicos de producción de H₂ y las temperaturas de los pretratamientos térmicos (las cuales pueden afectar significativamente a la comunidad microbiana), no facilitan la comparación entre los diferentes estudios (Ohnishi *et al.*, 2010). La tabla 5 muestra diferentes condiciones del pretratamiento térmicos aplicados a diferentes inóculos.

Tabla 5. Condiciones de tratamiento térmico aplicados a diversos inóculos

Tratamiento	Tipo de inóculo	Referencia
75 °C, 1 h	Lodos de una PTAR	(Kotsopoulos <i>et al.</i> , 2009)
100 °C, 15 min	Lodos anaerobio	(Lay <i>et al.</i> , 2012)
121 °C, 30 min	Lodos anaerobios de cervecería	(Ramos <i>et al.</i> , 2012)

PTAR: Planta de tratamiento de aguas residuales

➤ **Pretratamiento con compuestos químicos inhibidores**

Se ha reportado la existencia de varias sustancias químicas que inhiben el crecimiento de las arqueas metanogénicas con diferentes efectos y actúan de diferente forma. Estos compuestos se han aplicado al estudio de la producción de H₂ y se pueden clasificar en dos grupos: los inhibidores específicos y los no específicos. Los inhibidores específicos atacan directamente a las arqueas metanogénicas, y los no específicos inhiben microorganismos que realizan etapas anteriores a la metanogénesis (Lay *et al.*, 2012).

El cloroformo, fluoroacetato y acetileno son algunos ejemplos de inhibidores no específicos de la metanogénesis. Es conocido que el cloroformo (CHCl₃) inhibe parcialmente a las arqueas homoacetogénicas y las bacterias sulfato reductoras. El fluoroacetato (FCH₂COO) se utiliza para bloquear el metabolismo del acetato. Por su parte, la metanogénesis acetoclástica se puede inhibir con acetileno (C₂H₂) en sedimentos anaerobios (Valdez y Poggi, 2009).

Otros compuestos químicos como el 2-bromosulfanato (BES) y el 2,4,-pteridinedione (Lumazine) son ejemplos de inhibidores específicos, pues inhiben directamente la etapa de la metanogénesis al reducir la actividad de las arqueas metanogénicas.

3.2.4 Tipo de sustrato

Para que la PBH₂ sea un proceso sustentable, los sustratos utilizados deben cumplir con ciertos criterios. Los sustratos deben ser producidos a partir de recursos renovables, estar disponible en suficiente cantidad, que los pretratamientos sean mínimos y que sea de bajo costo (Edwards *et al.*, 2009).

Por otra parte, la composición y el tipo de sustrato utilizado determinan la producción y la composición final del H₂. En general sustratos puros como los carbohidratos: glucosa, sacarosa, han sido los más estudiados en reactores continuos para la PH₂ a escala laboratorio (Hafez *et al.*, 2009; Ramirez *et al.*, 2015; Sreethawong *et al.*, 2010). En la tabla 6 se presentan los resultados de PH₂ en continuo utilizando sustratos puros como la glucosa.

Tabla 6. Producción de hidrógeno en reactores continuos a partir de sustratos puros

Sustrato	T	pH	TRH	CO	TPH ₂	YH	H ₂	Referencia
	(°C)		(d)	(gSV/L _{reactor} / d)	(mmol H ₂ / L _{reactor} / d)	(mmol H ₂ / gSV)	(% V/V)	
Glucosa	35	5.5 6.5	8	103.0	1.6	2.8	67	Hafez <i>et al.</i> , 2010
Glucosa	35	5.5	6	50.8	1.0	2.3	64	Ramirez <i>et al.</i> , 2015
Glucosa	35	5.5	24	40.0	0.3	1.4	40	Sreethawong <i>et al</i> 2010

Aunque los sustratos puros han sido ampliamente estudiados, las investigaciones más recientes se enfocan a la utilización de residuos, como materias primas aptas para un proceso sostenible. La variedad de RSO que se podrían utilizar es tan amplia como los microorganismos utilizados en la PH₂ vía FO.

Existe una gran cantidad de residuos orgánicos que contienen sustratos aptos para la producción biológica de hidrógeno. Los azúcares simples como la glucosa, la sacarosa y la galactosa están presentes en muchos efluentes industriales y también se pueden obtener a partir de desechos agrícolas (Bedoya *et al.*, 2007).

Los RSO de comida industriales tienen una gran cantidad de carbohidratos que pueden utilizarse en la producción de biohidrógeno, debido a que su concentración varía y estos deben de ajustarse para obtener mayores rendimientos en el proceso.

En la tabla 7 se presentan datos sobre la PH₂ a partir de diferentes tipos de RSO industriales y domésticos. Como se observa cada tipo de RSO presenta diferentes rendimiento, composición y PH₂.

En general, deben evitarse el uso de sustratos de alto contenido de lignina, como aserrín, hojas secas, restos de poda entre otros, dado que no son factibles de descomponerse vía

FO y generan un barrera que impide la biodegradación de otros compuestos (Lo *et al.*, 2008).

Tabla 7. Producción de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos en reactores en continuos

	T	pH	TRH	CO	TPH ₂	YH	H ₂	Referencia
	(°C)		(d)	(gSV/L _{reactor} /d)	(mmol H ₂ /L _{reactor} /d)	(mmol H ₂ /gSV)	(% v/v)	
R. de papa sintéticos	35	5.5	0.25	40.0	57	1.4	45	Zhu <i>et al.</i> , 2008
R. de pulpa de oliva	35	5.0	0.3	179.4	14.3	0.8	29	Koutroli <i>et al.</i> , 2009
R. vinaza de yuca	60	5.2	3	3.0	9.9	3.3	N/D	Wang <i>et al.</i> , 2011
Pasto silado	35	5.6	6	10.0	17.0	1.7	24	Pakarine <i>et al.</i> , 2011
RSO de casa	32	5.3	48	37.5	71.4	1.9	N/D	Liu <i>et al.</i> , 2006
R. de pulpa de betabel	32	5.2	14	16.0	77.8	4.9	45	Hussy <i>et al.</i> , 2005

Nota: R= residuo, N/D= no disponible

3.2.5 Temperatura

La velocidad de las reacciones metabólicas de los microorganismos y las enzimas dependen de la temperatura y puede acelerarse como disminuir. Por esta razón afecta las rutas metabólicas de los microorganismos direccionando la PBH₂ hacia metano (van Haandel y van der Lubbe, 2007).

Se han realizado numerosos estudios a temperatura mesofílica (35°C) para producir hidrógeno a partir de RSO, se han reportado TPH₂ desde 14 hasta 80 mmol H₂/L_{reactor}/d (Zhu *et al.*, 2008).

Sin embargo, se ha encontrado que en condiciones termofílicas (55°C) los rendimientos y la PH₂ son aproximadamente 90% más altos que en la temperatura mesofílica, (Koutroli *et al.*, 2009). Pese a estas ventajas su aplicación se hace muy poco viable a gran escala debido a los altos requerimientos de calor que se debe suministrar al sustrato que ingresa al biorreactor (Pakarinen *et al.*, 2011).

3.2.6 Tamaño de partícula

Otro factor que afecta la PBH_2 vía FO en rectores continuos es el tamaño de partícula de los RSO que ingresan al biorreactor. En general, para alcanzar un determinado tamaño de partícula es necesario un pretratamiento específico, el cual consiste en la trituración de los RSO y un cernido con una maya con un tamaño requerido para el proceso (Bujanos y Moreno, 2013; Ramos *et al.*, 2012).

Recientemente en un estudio realizado por Moreno y Buitrón, (2011) demostraron que a menor tamaño de partícula se presenta un mayor rendimiento y PH_2 . Esto es debido a que las bacterias degradan más rápidamente las partículas pequeñas. El tamaño óptimo que encontraron fue un tamaño de partícula menor a 5 mm.

3.2.7 pH

El pH es uno de los factores ambientales que afecta la actividad microbiana, enzimática y celular, lo que permite considerar que es de gran trascendencia el rango específico de pH, el cual es determinante para poder obtener su óptima actividad.

Otra de las funciones que se obtienen del pH es que se puede utilizar para inhibir bacterias metanogénicas, las cuales tienen un crecimiento óptimo a pH neutral, por lo tanto, operar reactores con un pH ligeramente ácidos impediría la actividad de microorganismos consumidores de H_2 que producen CH_4 (Valdez y Poggi, 2009). Un control y elección del pH permite direccionar hacia la generación de H_2 y de productos terminales (ácido láctico, acético, butírico y propiónico y etanol), así como el tipo de microorganismos (Hafez *et al.*, 2010).

Liu *et al.* (2006), estudió el efecto que tiene el pH sobre la PH_2 durante la biodegradación de RSO en reactores por lotes y encontró que solo se produce en un rango de pH entre 4 a 6.5 con un máximo de producción acumulada de 20 mmol H_2 en un pH óptimo de 5.5 (ver figura 5).

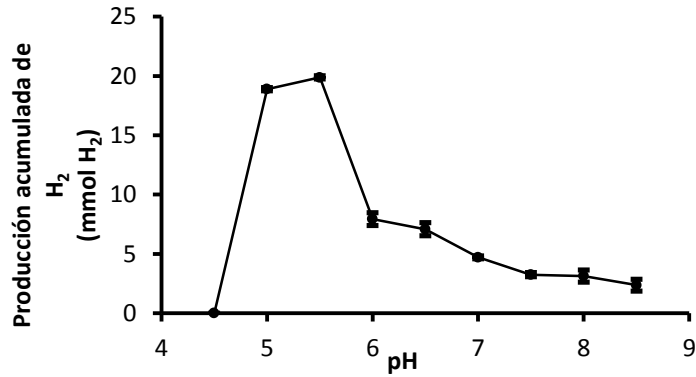


Figura 5. Efecto del pH en la producción biológica de hidrógeno

Fuente: Adaptada de Liu *et al.*, 2006

Sin embargo, a un pH neutral (pH 7) también se ha determinado que la producción de H₂ es adecuada en comparación a valores de pH más ácidos o básicos. Por otro lado, se ha reportado una mejora del rendimiento a un pH básico (9-11) en comparación a uno ácido (Kim y Shin, 2008). La discrepancia de tener un pH óptimo de operación dependerá de la procedencia, tipo y composición de los microorganismos del inóculo utilizado y su pretratamiento, la temperatura de operación, mantener el pH constante y el grado de generación de AGVs y la robustez del sistema (Pakarinen *et al.*, 2011).

3.2.8 Tiempo de residencia hidráulica

El TRH se define como el tiempo que tarda en pasar un volumen de RSO igual al volumen del biorreactor a través del biorreactor, es también el inverso de la tasa de dilución (GIZ, 2012). La tasa de dilución se define como la velocidad con la que se dispersan los RSO a través del biorreactor provocada por el flujo y se expresa bajo la ecuación 15.

$$TRH = \left(\frac{V}{Q}\right) = (tiempo) = \frac{1}{D} \quad \text{Ecuación 15}$$

Donde V: es el volumen del reactor, Q: es el flujo de RSO y D: es la tasa de dilución.

Los reactores continuos de tanque agitado podrían ser utilizados para seleccionar las poblaciones microbianas, cuyas tasas de crecimiento son capaces de igualar la dilución provocada por flujo volumétrico continuo. De esta manera, sólo las poblaciones

microbianas con tasas de crecimiento mayores que la tasa de dilución pueden permanecer en el reactor ($\mu_{\max} > D$) (Pakarinen *et al.*, 2011).

Sobre esta base, las altas tasas de dilución (bajos TRH) podrían ser utilizadas para hacer un completo retrolavado de las arqueas metanogénicas, las tasas de crecimiento específicas de arqueas metanogénicas son mucho más cortas que las bacterias productoras de H_2 ($0,0167$ y $0,083 \text{ h}^{-1}$, respectivamente) (Valdez y Poggi, 2009).

En la figura 6 se presenta el efecto típico del TRH sobre la TPH_2 . Se observa que conforme aumenta el TRH, la TPH_2 aumenta hasta que llega a un valor máximo. Al seguir aumentado el TRH, la TPH_2 disminuye, es decir, que existe un TRH donde se presenta un máximo local de TPH_2 . Esto se debe principalmente a que a TRH menores al óptimo se provoca un retro lavado de los microorganismos productores de hidrógeno. Por otro lado, a un TRH mayor al óptimo los microorganismos productores de H_2 cambian de rutas metabólicas y se favorecen reacciones que consumen H_2 y sustrato (Bakonyi *et al.*, 2014).

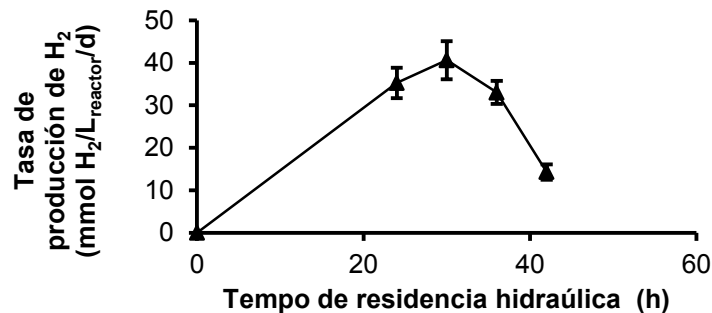


Figura 6. Efecto del tiempo de residencia hidráulica sobre la tasa de producción de hidrógeno

Fuente: Adaptada de kim, 2009

3.2.9 Carga orgánica

La carga orgánica (CO) indica la cantidad de materia orgánica que es alimentada al biorreactor por unidad de tiempo y por unidad de volumen de biorreactor, también se puede considerar como el flujo volumétrico de la materia orgánica por unidad de volumen o la concentración del sustrato entre el TRH (GIZ, 2012) y se expresa como en la ecuación 16.

$$CO = \frac{S_o Q}{V} = \frac{F_o}{V} = \frac{S_o}{TRH}$$

Ecuación 16

Dónde S_o : concentración del sustrato, Q : flujo de alimentación, V : volumen del reactor, F_o : flujo del sustrato en la alimentación y TRH : tiempo de residencia hidráulica. La concentración del sustrato se puede expresar en SV, sólidos totales (ST) o demanda química de oxígeno (DQO).

En un estudio realizado por Koutrouli *et al.*, (2009) demostraron que un aumento en la CO conlleva a una mayor producción y distribución de AGVs y otros productos intermedios, un aumento en la TPH_2 y composición de H_2 , pero una disminución en el YH. Los resultados de este estudio se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Efecto de la carga orgánica en la producción de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos en un reactor continuo

CO (g ST/L _{reactor} /d)	TPH_2 (mmol H_2 /gST)	YH (mmol H_2 /gST)	H_2 (% v/v)
43	12	0.19	26
93	18	0.13	27
149	21	0.08	30

Fuente: Adaptada de Koutrouli *et al.*, 2009

3.3 Fermentación oscura, cambios y perspectivas para la producción a gran escala

Actualmente a nivel internacional no existe una planta de PH_2 a escala industrial a partir de RSO o de aguas residuales. Sin embargo, existe información muy limitada en artículos y patentes sobre plantas a escala piloto (ver tabla 8) y una literatura muy restringida para procesos a nivel laboratorio.

Para que la PBH_2 por FO se convierta en un proceso técnica, ambiental y económicamente viable a escala industrial, las más recientes investigaciones se han enfocado entre otros a los siguientes aspectos: optimización de parámetros de diferentes tipos de biorreactores, procesos de modelado y simulación, uso de materiales de bajo

costo y finalmente la combinación de FO, digestión anaerobia y foto fermentación (Vatsala *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011).

Para el diseño de diferentes tipos de dichos biorreactores se hace necesario optimizar los principales parámetros de operación, los procesos de modelado y simulación ayudan a el diseño y optimización de los proceso a gran escala, el uso de materiales de bajo costo puede ayudar a acelerar la aplicación de esta tecnología a gran escala y finalmente la combinación de digestión anaerobia, FO y foto fermentación ayudan a maximizar los rendimientos energéticos (Ren *et al.*, 2011). A continuación se presenta un panorama de los aspectos mencionados.

3.3.1 Desarrollo de diferentes tipos de bioreactores y optimización de parámetros

El uso de biorreactores en la PBH₂ por FO es esencial pues es el lugar donde ocurren las reacciones que degradan la materia orgánica, por lo tanto el desarrollo de diferentes tipos de biorreactores y la optimización de sus correspondientes parámetros es fundamental para el diseño y simulación de los procesos a gran escala.

Actualmente muchas investigaciones están orientadas a desarrollar diferentes tipos de biorreactores a escala piloto para la PBH₂ y varios examinan los parámetros óptimos para diferentes configuraciones (ver tabla 8). Se han desarrollado diferentes tipos de reactores entre otros están anaerobios de flujo ascendente (UASB por sus siglas en inglés), anaerobios de lecho fluidizado, anaerobios granulares (AnEGSB por sus siglas en inglés) y RCTA (Wang *et al.*, 2009). Dentro de los parámetros más estudiados están la CO y el TRH (Ren *et al.*, 2006).

La configuración específica de un biorreactor puede influir en el proceso de la FO, especialmente a través de la retención de la biomasa. Por ejemplo en un estudio los reactores UASB presentaron un comportamiento más estable a bajos TRH, hasta 0.5 días, mientras que un RCTA causó lavado de células al bajar el TRH a 2,5 días (Kongjan y Angelidaki, 2010).

Los RCTA son ampliamente investigados ya que permite obtener los parámetros de proceso en diferentes circunstancias, sin embargo, la biomasa suspendida puede ser

fácilmente lavada a bajos TRH (Lin *et al.*, 2011). Las biopelículas y gránulos anaerobios son capaces de mantener concentraciones de biomasa, incluso para microorganismos de lento crecimiento. Por lo tanto se recomienda para el desarrollo y diseño de reactores el uso de biopelículas y gránulos con el fin de obtener microorganismos más activos y eficaces (Wang *et al.*, 2009).

3.3.2 Procesos de modelado y simulación con dinámica de fluidos computacional

En la actualidad, el diseño y escalamiento de la FO es en gran medida un proceso de ensayo y error que requiere mucho tiempo, costo y esfuerzo. Los procesos de modelado y simulación utilizan la dinámica de fluidos computacional (CFD) ya que proporciona una herramienta analítica que puede ayudar a identificar y superar muchos problemas a escala industrial y piloto antes de la operación real (Wan *et al.*, 2009).

En un estudio realizado en un RCTA se evaluó la hidrodinámica a escala industrial para la PBH₂ y se encontró que las velocidades de agitación de entre 50-70 rev/min son las condiciones más adecuadas para producir H₂ por FO de forma económicamente factible.

La dinámica de fluidos computacional proporciona herramientas para la optimización y el desarrollo de estrategias de optimización a escala industrial para RCTA y contribuye al avance de la PBH₂ por FO. Sin embargo, la evaluación en RCTA se basa en una teoría de dos fases (líquido, gas). Por lo tanto, para obtener eficiencias y resultados más precisos se debe considerar una teoría que considere las tres fases existentes (sólidos, líquido y gas) (Ren *et al.*, 2011).

3.3.3 Uso de materiales de bajo costo

Actualmente el elemento dominante en los costos de la PBH₂ es el sustrato y las instalaciones. Recientes investigaciones se han limitado al uso de sustratos puros como carbohidratos (glucosa, sacarosa entre otros) y residuos de agua ricos en carbohidratos (molasses) entre otros (ver tabla 8).

Conforme al desarrollo sustentable, la minimización de residuos por su utilización como materia prima en procesos de generación de productos de valor agregado, la PBH₂ a partir

de fuentes renovables, de fácil adquisición y de bajo costo ha presentado gran atención en los últimos años. RSO, residuos industriales orgánicos, aguas residuales y biomasa lignocelulósica con bajo valor comercial, se presentan con alto potencial para la PBH₂ (Lo *et al.*, 2008).

Entre estas posibles materias primas la biomasa lignocelulósica proveniente de la agricultura, los bosques y residuos industriales, es el más abundante y de bajo costo en la naturaleza. La producción mundial anual de biomasa lignocelulósica fue estimada en 220 billones de toneladas, equivalente a 60-80 billones de toneladas de petróleo crudo (Ren *et al.*, 2011). Este material contiene una alta cantidad de carbohidratos orgánicos (celulosa y hemicelulosa).

Sin embargo, este material tiene una estructura muy fuerte difícil de degradar por lo que es necesario un pretratamiento para hacer la celulosa más accesible a enzimas. Durante este proceso la lignina y todas las partes de la hemicelulosa son disueltas por hidrólisis (GIZ, 2012).

En el futuro la hidrólisis se podría llevar a cabo por enzimas celulasas que convierten la celulosa en hexosa. En comparación con los microorganismos productores de H₂ que fermentan la hexosa, solo unos que fermentan la pentosa son identificados. La identificación y caracterización de estos microorganismos que fermentan la pentosa es necesaria para el avance en la PH₂ a partir de material lignocelulósico (Lo *et al.*, 2008).

3.3.4 Combinación de fermentación oscura, digestión anaerobia y fotofermentación

Para aumentar el rendimiento energético en una biorrefinería que genera combustibles a partir de residuos orgánicos de diferentes tipos, es necesario estudiar si es posible combinar los procesos de FO, digestión anaerobia y foto fermentación. En los procesos de FO y foto fermentación se produce el H₂ y en el proceso de digestión anaerobia se genera metano.

Se han estudiado las siguientes dos combinaciones; FO acoplada a digestión anaerobia (Wang y Zhao, 2009) y FO con foto fermentación (Liu *et al.*, 2010). No se han presentado estudios donde se acoplen de forma secuencial estos tres procesos.

Se conoce que los productos de la FO contienen una alta cantidad de ácidos orgánicos de cadena larga y alcoholes, y que las bacterias foto fermentativas pueden convertir estos ácidos en más H_2 y de esta forma maximizar la PH_2 y la eficiencia de conversión del sustrato. En el presente solamente se conocen dos formas para combinar estos procesos; proceso integrado y proceso secuencial (Ren *et al.*, 2011).

En el proceso integrado, bacterias fermentativas y fotofermentativas coexisten simultáneamente en un sistema de reacción y pueden reducir los costos del reactor productor de hidrógeno. Sin embargo, existe una gran dificultad para acoplar estos dos sistemas debido a que las bacterias fermentativas presentan una máxima velocidad de crecimiento en condiciones ligeramente ácidas ($pH=5.5$) y las bacterias foto fermentativas en condiciones neutras ($pH=7$).

En contraste, el proceso secuencial es fácil de operar, porque los dos tipos de bacterias crecen en sus condiciones óptimas en un reactor por separado. Por lo tanto requiere de dos biorreactores lo que incrementa los costos y requerimiento de espacio para el proceso de PH_2 .

3.3.5 Experiencias de producción biológica de hidrógeno a nivel piloto.

Es muy poca la información sobre plantas piloto de PH_2 por FO que se ha publicado. Sin embargo, enseguida se presentan cinco experiencias que se han desarrollado a nivel mundial (ver tabla 9). Dos de estos trabajos utilizaron como sustrato residuos de comida, uno el efluente de una destilería de caña de azúcar, uno molasas y por ultimo uno utilizó glucosa pura.

En primer lugar, en la Universidad Tongji de China Wang *et al.* (2011) trabajaron en una planta piloto para producir H_2 a partir de residuos de comida (ver tabla 9). Esta planta contaba con un tanque de igualación y un RCTA de 450 L.

Por su parte Wang y Zhao, (2009) estudiaron el efecto que tiene la carga orgánica en el YH. Alimentaron residuos de comida al RCTA con cargas orgánicas que van de 15 a 37 $kg\ SV/m^3_{reactor}/d$ y encontraron condiciones óptimas de PH_2 con una carga orgánica de 26 $kg\ SV/ m^3_{reactor} /d$ con un rendimiento óptimo de $0.065\ m^3\ H_2/kg\ SV$.

Tabla 9. Plantas piloto de producción de hidrógeno bajo diferentes estrategias de operación

Tipo de reactor	Tamaño de reactor (m ³)	Sustrato	Inóculo origen	YH	TPH ₂	Fuente
S-RCTA	0.45	Residuos de comida	Lodo granular anaerobio	0.065 m ³ H ₂ /kg SV	N/D	Wang y Shao, 2009
AnLF	60	Residuos de comida	Lodo anaerobio de una PTAR	0.29 m ³ H ₂ /kg SV add	3.55 m ³ H ₂ /m ³ /d	Han <i>et al.</i> , 2006
RCTA	2	Molazas	Lodo anaerobio de una PTAR	26.13 mol H ₂ /kg DQO	5.57 m ³ H ₂ /m ³ /d	Ren <i>et al.</i> , 2006
RCTA	0.4	Sacarosa	Lodo anaerobio de una playa del este de Taiwan	10.4 mol H ₂ /mol sacarosa	15.59 m ³ H ₂ /m ³ /d	Lin, <i>et al.</i> , 2011

Nota: AnLF: Reactor anaerobio de lecho fijo, RCTA: reactor continuo de tanque agitado

Por otro lado, Han *et al.*, (2006) en Corea del sur realizaron un trabajo para optimizar la PH₂ por FO y con estos resultados diseñaron y operaron una planta piloto. Dicho equipo trabajó en un reactor anaerobio de lecho fijo (AnLF) la FO de residuos de comida provenientes de un restaurante utilizando la tasa de dilución (D) como medio para mejorar las condiciones ambientales para la PH₂ (ver tabla 9).

La eficiencia máxima de degradación de 71.4% la obtuvieron mediante el ajuste de la tasa de dilución de 4.5 a 2.5 d⁻¹ y el rendimiento y TPH₂ máxima que obtuvieron en la planta piloto fue de 0.29 m³ H₂/kgSV adheridos y 3.55 m³ H₂/m³_{reactor}/d respectivamente.

En la India, Vatsala *et al.*, (2008) evaluaron la factibilidad de mejorar la PH₂ a escala piloto a partir del efluente de una destiladora de caña de azúcar usando diferentes microorganismos como inóculo (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes* y *Rhodopseudomonas palustris*) en un RCTA en escala de 1 m³.

El rendimiento y la PH₂ promedio que reportaron fue de 2.76 mol H₂/mol glucosa y 0.53 kg H₂/100 m³/d respectivamente. Con estos resultados demostraron la factibilidad de utilizar el efluente de la caña de azúcar como una fuente para producir energía limpia y renovable.

Una planta piloto de PH_2 por FO fue construida en la universidad de Feng Chia en Taiwan por Lin *et al.*, (2011). Esta planta estaba compuesta de un tanque de alimentación de nutrientes, un tanque de alimentación de sustrato, un tanque de igualación, un RCTA de 400L, un separador sólido líquido y un panel de control. El inóculo se obtuvo de un lodo anaerobio de una playa del este de Taiwan.

La planta se operó con unas cargas orgánicas que van de 40-240 kg DQO/m³_{reactor}/d utilizando molasas como sustrato. La concentración máxima del hidrógeno en el biogás fue de 37 %, la máxima velocidad de producción (16 m³ H₂/m³_{reactor}/d) y rendimientos de hidrógeno (1.04 mol H₂/mol sacarosa) se obtuvieron a una carga orgánica de 240 kg DQO/m³/d y los microorganismos dominantes fueron las bacterias *Clostridium pasteurianum*.

Para terminar con estas experiencias, Ren *et al.*, (2006) estudiaron en una planta piloto la PH_2 a partir de melasas (compuestas de 53% sacarosa). Esta planta contaba con un tanque de alimentación, un RCTA de 1.5 m³ de volumen útil, un filtro de absorción de CO₂ y un sistema de control. El reactor fue operado bajo un rango de carga orgánica que va de 3.11-85.57 kg DQO/m³_{reactor}/d.

Los resultados que presentaron son los siguientes: el biogás y el hidrógeno incrementaron con el aumento de la carga orgánica pero decrecieron a altas cargas orgánicas. La composición del hidrógeno en el biogás estuvo en un rango de 40-52%. La TPH₂ máxima obtenida fue de 5.57m³ H₂/m³/d y un rendimiento de 26.13 mol H₂/Kg DQO_{removida}.

3.4 Fermentación oscura vs digestión anaerobia

En el siguiente apartado se presenta un análisis de los procesos de FO y digestión anaerobia. En primer lugar se presenta una descripción, a nivel conceptual, de las etapas que se realizan en cada una de las tecnologías. Se finaliza con un análisis de las dos tecnologías considerando aspectos técnicos económicos y ambientales.

3.4.1 Proceso industrial de fermentación oscura

Como se presenta en la figura 7, una planta de PH₂ por FO a partir de RSO, descrita de forma conceptual, se conforma de un área de recepción, un tanque de mezclado o igualación, un biorreactor productor de hidrógeno, una unidad de separación de gases, un sistema de cogeneración de electricidad y por último un foto biorreactor productor de hidrógeno (Pandey *et al.*, 2013).

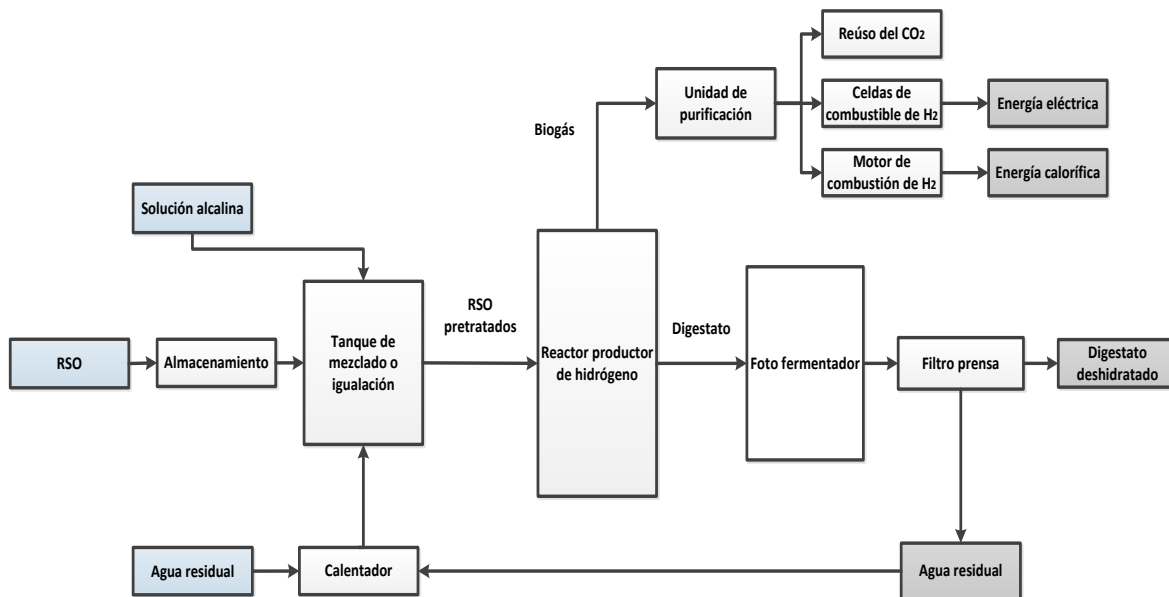


Figura 7. Digrama de flujo de proceso de la fermentación oscura

Fuente: adaptada de Reith *et al.*, 2003; Pandey *et al.*, 2013 y Chang *et al.*, 2011

En el inicio del proceso, los RSO provenientes de casas habitaciones ingresan al área de almacenamiento, después pasan a un tanque de mezclado o igualación donde son triturados (hasta un tamaño de partícula de 5 mm) y mezclados con agua residual previamente calentada hasta una temperatura de 55°C lo que ocasiona que la temperatura de la mezcla final sea de 35 °C.

Como segundo proceso, los RSO son colocados en un biorreactor productor de hidrógeno donde son degradados por microorganismos anaerobios para producir una mezcla gaseosa llamada biogás compuesta de hidrógeno y bióxido de carbono y una mezcla sólida llamada digestato compuesta de ácidos grasos volátiles. Las condiciones típicas de operación a nivel piloto son 35°C y TRH de 6 hasta 32 horas (Reith *et al.*, 2003).

El biogás producido en la FO ingresa a un sistema de limpieza donde son reducidas la concentración de humedad, sulfuro de hidrógeno y el bióxido de carbono, para esto se utilizan filtros y biofiltros de gas. El hidrógeno (con 80% v/v de pureza aproximadamente) se utiliza en una celda de combustible donde se produce una reacción electroquímica que consume hidrógeno y oxígeno para producir vapor de agua y energía eléctrica (Chang *et al.*, 2011). Por último, el digestato se envía a un foto fermentador donde los ácidos grasos son degradados por bacterias foto fermentativas para producir más cantidad hidrógeno. Por otra parte el digestato producido se envía a un filtro prensa donde es deshidratado.

➤ **Ventajas y desventajas de la fermentación oscura**

Las principales ventajas y desventajas de la FO se presentan en la tabla 10. Su principales ventajas son las siguientes: genera un combustible amigable con el ambiente con bajas emisiones de gases de efecto invernadero, tiempos de residencia bajos (6 veces menores que la digestión anaerobia) provocan que el volumen de los biorreactores productores de hidrógeno sean menores que los reactores de la digestión anaerobia, por último, se pueden utilizar una gran cantidad de sustratos como RSO y aguas residuales, lo que provoca que la materia prima sea renovable y de bajo costo (Reith *et al.*, 2003).

Tabla 10. Ventajas y desventajas de la fermentación oscura

Ventajas	Desventajas
Produce un combustible limpio.	Tecnología desarrollada a escala piloto y laboratorio.
Tiempos de residencia hidráulica bajos.	Información escasa para plantas pilotos.
Una gran variedad de sustratos pueden ser utilizados.	El inóculo requiere de un pretratamiento.
Bajos requerimientos de espacio.	Bajos rendimientos de producción de hidrógeno
Cotos de instalación bajos.	pH ácido de 5-6.
	Bajo contenido del hidrógeno en el biogás de 20-40% v/v.
	Produce 96% de digestato del total de RSO.
	Reportes con unidades no homogéneas.
	No existe una planta a nivel industrial.

Fuente: Adaptada de Reith *et al.*, 2003 y Pandey *et al.*, 2013

De acuerdo a la tabla 10, dentro de sus principales desventajas entre otras están; es una tecnología comprobada únicamente a escala piloto, no existe una planta a nivel industrial por causa de los bajos rendimientos alcanzados actualmente, la información publicada de plantas piloto productoras de hidrógeno es muy escasa, el inóculo requiere de un

tratamiento para inhibir las arqueas metanogénicas, produce gran cantidad de biomasa y por último no existe una estandarización de las unidades por lo que los reportes presentan diferentes unidades.

3.4.2 Digestión anaerobia

Una planta de tratamiento de RSO vía digestión anaerobia está compuesta de un área de recepción, un tanque de mezclado o igualación, un biorreactor de digestión anaerobia, una planta de generación de energía eléctrica y una planta de composta (ver figura 8) (GIZ, 2012).

Los RSM ingresan al área de recepción donde son almacenados por 2 días, después ingresan al tanque de mezclado o igualación donde son triturados (hasta un tamaño de partícula de 5mm) y mezclados con agua caliente, que sirve, para disminuir la concentración de sólidos totales y aumentar la temperatura.

Como segunda parte del proceso, los RSO previamente pretratados son introducidos en un biorreactor anaerobio donde son digeridos para producir biogás que está compuesto mayoritariamente por CH₄ y bióxido de carbono y un digestato rico en ácidos grasos. Las condiciones de operación típicas son TRH de 20 a 30 días, temperatura mesofílica de 35°C y un pH neutro (Khalid *et al.*, 2011).

El biogás que produce la digestión anaerobia ingresa a un sistema de limpieza donde se remueve sulfuro de hidrógeno (H₂S) y humedad. Una vez que el biogás libre de agua y H₂S pasa a una unidad de cogeneración donde se produce energía eléctrica como un producto final del cual parte se utiliza para satisfacer las necesidades energéticas de la planta y la producción restante se envía para uso doméstico (GIZ, 2012).

Por otra parte, el digestato proveniente del biorreactor anaerobio ingresa a un filtro prensa donde es deshidratado, una cierta proporción de agua residual, que se genera en el proceso, se recircula al tanque de mezclado y la restante se envía a una planta de tratamiento de agua. Por último, el digestato deshidratado pasa a una planta de producción de composta.

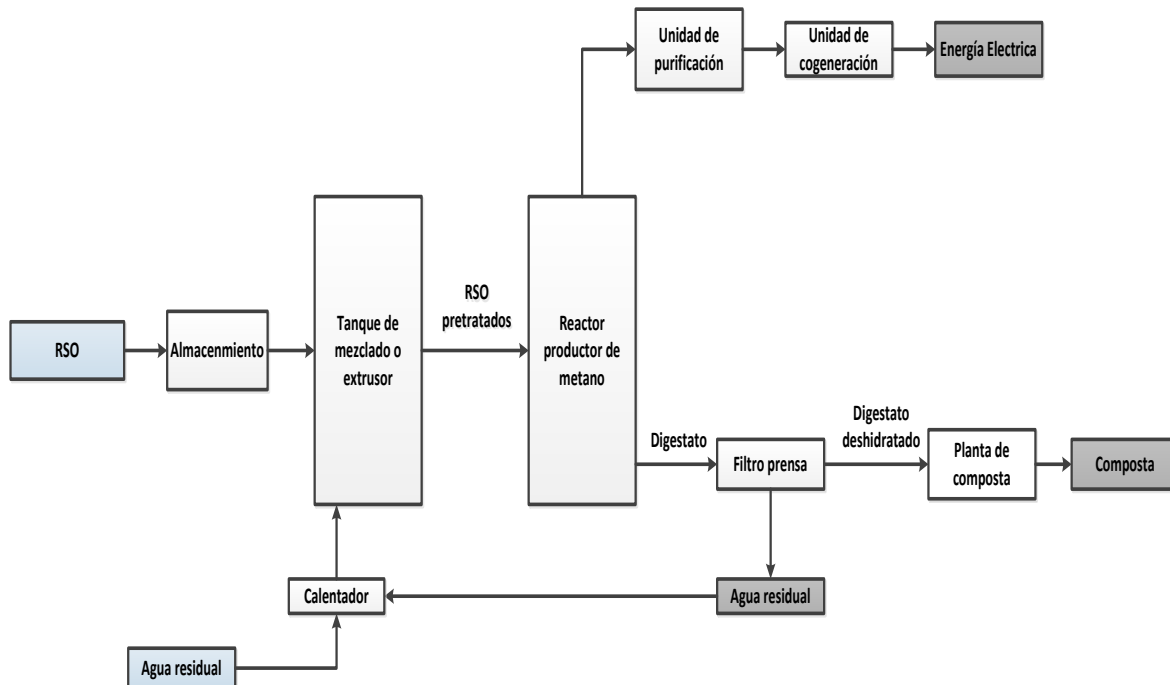


Figura 8. Diagrama de flujo de proceso de la digestión anaerobia

Fuente: Adaptada de GIZ, 2012 y Khalid *et al.*, 2011.

Como se observa en el diagrama de flujo de la Figura 8, la materia prima del proceso de digestión anaerobia es principalmente los RSO y el agua residual del proceso, los principales productos son energía eléctrica y composta para uso agrícola y los beneficios son la disminución del volumen de RSO que llegan a sitios de disposición final y la generación de productos de valor agregado (Ren *et al.*, 2006)

➤ **Ventajas y desventajas de la digestión anaerobia**

En la tabla 11 se presentan las principales ventajas y desventajas del proceso industrial de tratamiento de RSO por digestión anaerobia. Las principales ventajas tecnológicas son las siguientes: es una tecnología probada a nivel industrial, existe mucha información disponible, es económicamente viable. Por otro lado, las principales ventajas técnicas que presenta esta tecnología son que puede tratar RSO con alto contenido de sólidos totales, lo que reduce el consumo de agua de proceso, y el bajo requerimiento energético y espacial.

Tabla 11. Ventajas y desventajas de la digestión anaerobia

Ventajas	Desventajas
Tecnología factible a nivel industrial.	Elevados TRH.
Mucha información disponible.	Produce combustible con emisiones de gases de efecto invernadero.
pH neutro.	Los costos de operación y la inversión son muy altos.
Alto contenido de ST de 10-45%.	Las arqueas metanogénicas son muy sensibles a compuestos químicos.
El inóculo no requiere de pretratamiento.	
Económicamente viable.	
Bajos costos de instalación.	
Requerimientos de espacios bajos.	

Fuente: Adaptada de GIZ, 2012 y Khalid *et al.*, 2011

Como se presenta en la tabla 11, dentro de las principales desventajas de la digestión anaerobia se encuentran los elevados TRH, que ocasiona un alto requerimiento de volumen del biorreactor, produce un combustible que emite gases de efecto invernadero, los microorganismos que producen el CH₄ son muy sensibles a los compuestos químicos y por último el aspecto que más ha frenado la aplicación de esta tecnología en Latinoamérica son los elevados costos de instalación y operación.

3.4.3 Análisis técnico económico y ambiental

Enseguida se presenta un análisis de los principales aspectos técnicos y económicos de los procesos tecnológicos que se realizan en la FO y la digestión anaerobia para tratamiento de RSO (ver tabla 12). Los aspectos técnicos considerados son el rendimiento másico, energético y las condiciones de operación del proceso, en el caso de los aspectos económicos se presentan los costos unitarios de inversión y operación.

Iniciando con este análisis, en el caso de los aspectos técnicos la digestión anaerobia presenta de 2 hasta 10 veces mayor producción y rendimiento de biogás con una mayor composición de CH₄ (entre 40-80% v/v). Este mismo comportamiento no se presenta en el rendimiento energético donde la FO donde a pesar de producir menor cantidad de biogás genera mayor cantidad de energía neta (Reith *et al.*, 2003), esto es a causa del poder calorífico del hidrógeno que es 2.5 veces mayor que el del CH₄.

Tabla 12. Aspectos técnicos y económicos de la fermentación oscura y la digestión anaerobia

Aspectos		Características	Unidades	DA	FO
Técnicos	Rendimiento másico	Producción de biogás	m ³ /m ³ d	20-100	4.0-11
		Rendimiento de biogás	m ³ /t SV	360-500	90-160
		Porcentaje de H ₂ o CH ₄	% v/v	40-80	20-40
	Rendimiento energético	Producción de energía	Gj/t	0.8	5.5
		Consumo de energía	Gj/t	0.4	1.9
	Condiciones de operación	TRH	D	20-30	7.0-24 h
		Sólidos totales	%	10-32	6-12
pH			6.8-7.2	5.5-6.0	
Económicos	Costos unitarios	Inversión unitaria	USD \$/t	103	90
		Costo de operación unitario	USD \$/t	82	46

Fuente: Adaptada de Reith *et al.*, 2003; Demirel *et al.*, 2010 y Chang *et al.*, 2011

Por otro lado, con respecto a las condiciones de operación los bajos TRH de la FO provocan que el volumen de reactor requerido se ha de menor tamaño que el requerido en la digestión anaerobia para tratar la misma cantidad de RSO, en el caso del pH neutro y alto contenido de ST provoca que la digestión anaerobia requiera menor cantidad de agua de proceso y menor cantidad de servicios auxiliares en la planta de proceso.

En el caso de los costos unitarios, no hay mucha diferencia en la inversión unitaria de los dos procesos. Sin embargo, la inversión de la FO es (10%) menor, esto es debido a que el volumen de reactor requerido en la Digestión anaerobia es hasta 6 veces mayor que la FO. Por otro lado los costos de operación de la FO son aproximadamente 2 veces menor que la Digestión anaerobia. Por lo anterior la FO es económicamente más viable que la Digestión anaerobia (Chang *et al.*, 2011).

4. Metodología

La metodología que se desarrolló en el presente trabajo de tesis se bosqueja en el diagrama que se presenta en la figura 9 y se divide en 4 etapas, las cuales se describen a continuación.

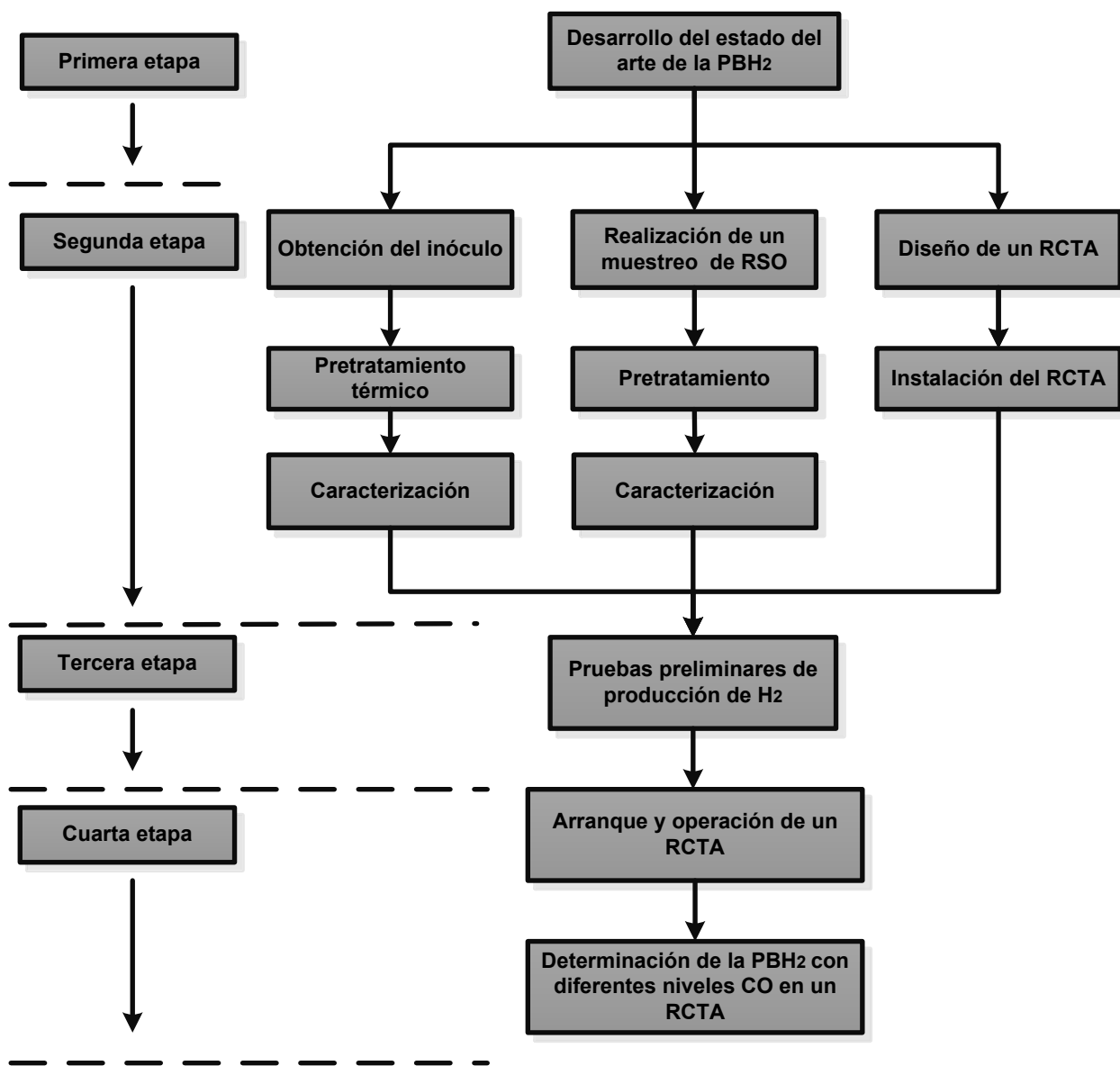


Figura 9. Diagrama de la Metodología

1. Desarrollo del estado del arte de la PBH₂.
2. Obtención de los requerimientos para operar un RCTA productor de hidrógeno partir RSO.
3. Pruebas preliminares de PH₂ en reactores por lotes a partir de RSO.
4. Arranque y operación de un RCTA para producir H₂ a partir de RSO.

4.1 Desarrollo del estado del arte

En la primera etapa se realizó una revisión bibliográfica del estado del arte sobre los procesos involucrados en la PBH₂ vía FO a partir de RSO. Esta etapa también se conformó de un estudio acerca de la situación actual de los RSO a nivel nacional. La información recopilada en esta etapa se utilizó para realizar el marco teórico y los antecedentes de la presente tesis.

En el caso del estado del arte de la PBH₂ vía FO se revisaron los principales procesos biológicos y químicos involucrados, las tecnologías aplicadas (a nivel laboratorio y piloto) los parámetros que afectan la PBH₂ y por último los requerimientos para operar un reactor productor de H₂ en el laboratorio.

Con base en esta información se diseñaron los experimentos realizados durante la segunda y tercera etapa de esta metodología.

4.2 Obtención de los requerimientos para operar un reactor productor de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos

La segunda etapa se dividió en las siguientes tres subetapas:

1. Obtención, pretratamiento y caracterización del inóculo.
2. Obtención, pretratamiento y caracterización de los RSO.
3. Diseño e instalación de un RCTA escala laboratorio.

4.2.1 Obtención, pretratamiento y caracterización del inóculo

Como inóculo se utilizó un lodo granular anaerobio proveniente de un reactor anaerobio que trata aguas residuales de la industria cervecera. Dicho lodo se sometió a un tratamiento térmico en una estufa de laboratorio durante 24 h a una temperatura de 105°C con el propósito de seleccionar bacterias que forman esporas en condiciones de estrés térmico (bacterias hidrolíticas y las formadoras de hidrógeno especialmente del género *Clostridium*) e inactivar las arqueas metanogénicas que no tienen la capacidad de esporular (Valdez y Poggi 2009).

Después del tratamiento térmico, el inóculo se trituró en un mortero y posteriormente se tamizó con una maya de 5 mm. Al final de este procedimiento se obtuvo un inóculo en polvo con un tamaño de partícula menor a 5 mm de color negro y con fuerte olor a alquitrán.

Una vez que se obtuvo el inóculo en polvo se procedió a su caracterización fisicoquímica donde se determinaron la concentración de humedad, ST, SV, DQO, carbohidratos y proteínas siguiendo los procedimientos que se describen en el apartado 4.6. Una vez caracterizado el inóculo se alimentó al RCTA con una concentración de 15 g/L base seca.

4.2.2 Obtención, pretratamiento y caracterización de los residuos sólidos orgánicos

La muestra de RSO que se utilizó para alimentar el reactor productor de H₂ se obtuvo a partir de un muestreo de RSO generados en un restaurante tipo buffet ubicado en la ciudad de Querétaro, México.

El muestreo de RSO se realizó durante siete días, este se basó en los procedimientos para muestreo de residuos sólidos descritos en las normas mexicanas (NMX-AA-19-1985, NMX-AA-22-1985 y NMX-AA-61-1985) referentes al tema. Durante estos días se acudió a recolectar los RSO generados en el restaurante. Una vez recopilados fueron trasladados al LIPATA donde se le determinaron las siguientes propiedades físicas *in situ*; el peso volumétrico (NMX-AA-19-1985), composición (NMX-AA-22-1985).y generación (NMX-AA-61-1985).

Después de la caracterización física *in situ*, se procedió al pretratamiento de la muestra de RSO en el laboratorio, el cual consistió en disminuir el tamaño de partícula de dicha muestra (menor a 5 mm). Para esto, la muestra de RSO se trituró con un molino industrial de 1HP de potencia (JR MJ22) y posteriormente se tamizó en una maya de 5 mm. Este procedimiento se realizó debido al efecto que ejerce el tamaño de partícula sobre la PBH₂. Se ha reportado, que la reducción del tamaño de partícula ejerce un efecto positivo sobre la PBH₂ (Moreno y Buitrón, 2011).

Finalizado el pretratamiento, las muestras se almacenaron en tambos de 50 L a una temperatura de 4°C. Al término del muestreo las muestras sólidas pretratadas de RSO se mezclaron y homogenizaron en un contenedor de 200L. La muestra homogénea fue almacenada en bolsas herméticas de 1kg a una temperatura de -20 °C para su conservación hasta su posterior uso.

Para la caracterización fisicoquímica de la muestra en el laboratorio se tomaron al azar tres bolsas de 1 kg de muestra almacenadas a -20°C, a cada una se le determinó las siguientes propiedades fisicoquímicas: humedad, ST, SV, AGVs, DQO, carbohidratos, proteínas y pH siguiendo los procedimientos que se describen en el apartado 4.6.

4.2.3 Diseño e instalación de un reactor continuo de tanque agitado escala laboratorio

Se diseñó e instaló un RCTA para producir H₂ a partir de RSO. El reactor fue construido en material acrílico y fue equipado con un control de temperatura, un control de pH, agitación continua, dos entradas; una para alimentación de los RSO en fase húmeda y la restante para la alimentación de hidróxido de sodio NaOH y dos salidas; una para el biogás y la otra para el digestato que se produce en la FO (ver figura 10).

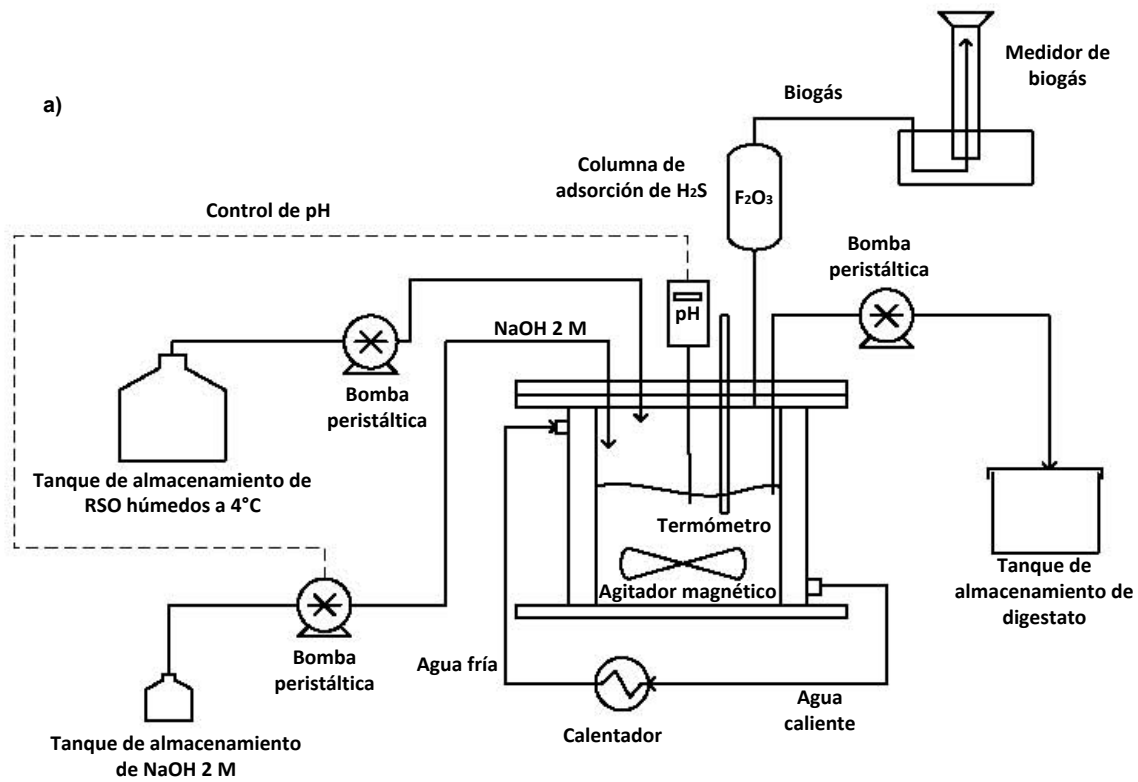


Figura 10. Diagrama de flujo de proceso de producción de hidrógeno (a) y fotografía del arreglo experimental (b).

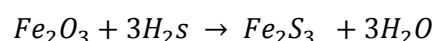
El RCTA se diseñó con base en la ecuación 11, con las siguientes bases de diseño: TRH máximo de 24 h, flujo de alimentación mínimo de RSO (Q) de 1.7 L/d y una relación longitud diámetro (L/D) de 1.3. El RCTA se construyó en acrílico, con geometría cilíndrica de volumen total de 2.3 L, volumen de reacción de 1.7 L, cabeza reactor de 0.6 L, una altura de 19 cm y un diámetro 12.4 cm.

En el caso del control de pH se realizó utilizando un controlador de pH (Black Stone BL931700) acoplado a una bomba peristáltica (Watson Marlow 120U) que alimentaba una solución de NaOH 2 N cada vez que el pH descendía a 5.4 y se detenía hasta que llegaba a un pH de 5.5.

Por su parte, el control de temperatura se realizó con una cubierta de agua caliente (chaqueta de calentamiento) que se encontraba alrededor del reactor. En la parte inferior de la chaqueta se alimentaba agua a una temperatura de 37 °C con un flujo de 1 L/min desde de una parrilla de calentamiento eléctrica y salía en la parte superior de la chaqueta con una temperatura de 36°C. El agua fría que salía de la chaqueta se alimentaba a la parrilla de calentamiento para obtener un ciclo de calentamiento cerrado. La agitación constante se realizó con un agitador eléctrico (Stable temp 3407-10) con una frecuencia de 90 rpm.

Los RSO se alimentaban al reactor con un flujo constante por medio de una bomba peristáltica (Cole Parmer System 7553-12) desde un tanque de almacenamiento de RSO diluidos a temperatura de 4°C. El tanque de alimentación se encontraba completamente mezclado, por medio de un agitador de paleta eléctrico (Cole Parmer System), con el fin de evitar la sedimentación de los sólidos suspendidos.

El biogás producido se transportó por convección natural desde la cabeza del reactor hacia una columna empacada de adsorción de H₂S y después a un sistema de medición de flujo de biogás. La columna empacada se fabricó de policloruro de vinilo (PVC) y se rellenó con óxido de hierro (Fe₂O₃). La absorción del H₂S se realizó en las virutas de Fe₂O₃ (ver ecuación 17). El límite de absorción del H₂S en Fe₂O₃ es de 56% (Kohl y Nielsen, 1997)



Ecuación 17

Una vez que la columna se saturaba se regeneraba haciendo pasar aire por el interior de la columna para oxidar el compuesto Fe_2S_3 (ver ecuación 18). Así el Fe_2S_3 vuelve a dar la vuelta al ciclo tecnológico para convertirse nuevamente Fe_2O_3 .



El sistema de medición de flujo del biogás se realizó por el método de desplazamiento de líquido, el cual consiste en medir el volumen de biogás desplazado en una probeta invertida rellena con agua en un intervalo de tiempo. Por su parte el digestato se transportó con una bomba peristáltica (Cole Parmer Sistem 7553-12) desde el RCTA hasta un tanque de almacenamiento de 4L.

4.3 Pruebas preliminares de producción de hidrógeno

En esta etapa se determinó el PBG_{H_2} de los RSO muestreados y el efecto que tiene la concentración de residuos de limón (CRL) sobre la PBH_2 . Para dichas pruebas se utilizaron rectores por lotes (frascos cerrados de 250 mL). A cada reactor se le agregó 2.2 g de inóculo previamente pretratado, se aforó a 150 mL con RSO de concentración al 2% de ST y finalmente se gaseó con nitrógeno para obtener condiciones anaerobias.

El sistema utilizado para las pruebas preliminares se equipó con un sistema de control de temperatura y agitación constante (ver figura 11). El control de temperatura estaba formado por una parrilla de calentamiento de agua, el agua caliente ($37^\circ C$) era transportada a un baño maría donde estaban sumergidos los reactores para mantener la temperatura a $35^\circ C$. Después, el agua del baño maría se recirculaba otra vez a la parrilla de calentamiento para cerrar el ciclo de calentamiento. La agitación se realizó con una parrilla de agitación múltiple (Cole palmer) con una frecuencia de 90 rpm.

Cada reactor estaba cerrado herméticamente y tenía una manguera de desfogue para el biogás producido de tal manera que la presión parcial del H_2 en el espacio de cabeza del reactor permaneciera constante. El biogás de desfogue era colectado en una probeta invertida rellena con agua, de tal forma que la producción de biogás se midió por el método de desplazamiento de líquido.

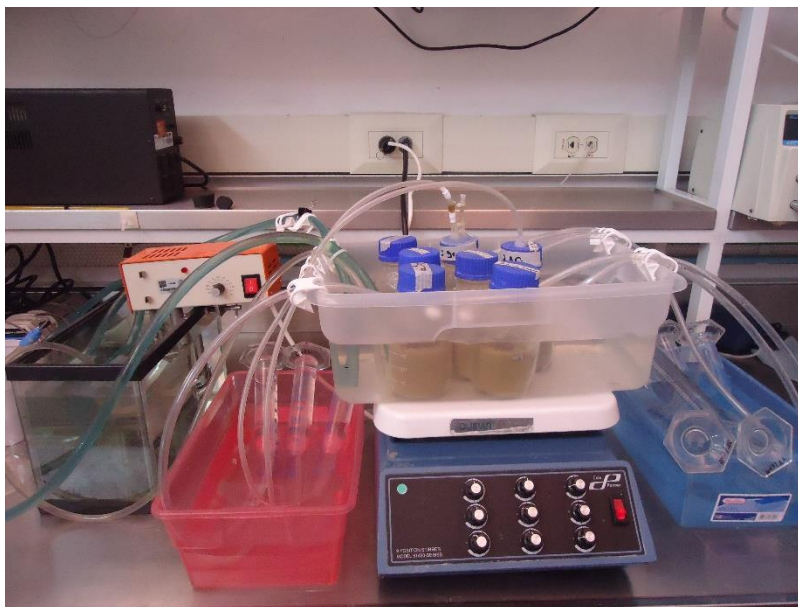


Figura 11. Arreglos de los biorreactores por lotes

Los resultados obtenidos durante estas pruebas preliminares de producción de H_2 en reactores por lotes a partir de RSO se sometieron a un análisis cinético. Los datos obtenidos experimentalmente se ajustaron al modelo cinético de Gompertz modificado que se presenta en la ecuación 19 (Ramos *et al.*, 2012).

$$H = H_{max} * \exp \left[1 - \exp \left(\frac{2.7182 * R_{max}(\lambda - t)}{H_{max}} \right) \right] \quad \text{Ecuación 19}$$

Donde H (mmol H_2 /gSV) es el rendimiento acumulado de H_2 en el tiempo t (d); H_{max} (mmol H_2 /gSV) representa rendimiento acumulado de H_2 máximo; R_{max} (mmol H_2 /gSV/d) representa la tasa de producción específica de hidrógeno máxima, y λ (d) representa el tiempo de latencia. En seguida se describe la metodología para determinar el efecto de los residuos de limón sobre la producción de H_2 y el $PBGH_2$ de los RSO.

4.3.1 Efecto de los residuos de limón en la producción biológica de hidrógeno

Los cítricos son considerados por muchos autores como bactericidas, estas propiedades están relacionadas con la composición química de los aceites esenciales que se encuentran presentes en la cáscara (Escobar, 2012). Los principales responsables de la toxicidad son los compuestos volátiles, especialmente los monoterpenoides oxigenados

como el limoneno, el pineno, entre otros. En el caso del limón, comparado con otros cítricos, presenta un mayor grado de toxicidad debido a que presenta mayor concentración de estos compuestos (Espina *et al.*, 2013).

La composición promedio de los aceites esenciales del limón se presenta en la tabla 13. Se observa que los compuestos que se encuentra en mayor proporción son el limoneno y el pineno.

Tabla 13. Composición de los aceites esenciales del limón

Compuesto	Composición (g/kg de limón)
Limoneno	52.9
Pineno	6.3
Creno	5.9
Geranial	1.1
Careno	0.8

Fuente: adaptado de (Salvatore *et al.*, 2004).

Durante la caracterización física de los RSO se encontró que la concentración de los cítricos era mayor a 20% por lo que se planteó estudiar el efecto de la CRL sobre la PBH₂. Para lo que se planteó el siguiente diseño experimental.

Como variable independiente se planteó a la CRL en los RSO húmedos y como variable de respuesta al H. Después, se determinó el rendimiento acumulado de H₂ con cuatro niveles de CRL 0, 10, 30 y 60 g/L bajo las siguientes condiciones de operación: 35°C, 90 rpm de agitación y 5.5 de pH. Para dicho fin, 4 reactores por lotes se utilizaron alimentados como se mencionó al inicio del presente subcapítulo. Este procedimiento se realizó por triplicado.

4.3.2 Determinación del potencial bioquímico de generación de hidrógeno de los residuos sólidos orgánicos

Se realizó una prueba de PBGH₂ a los RSO, con el objetivo de conocer su capacidad para producir hidrógeno. Para esto, se llevó a cabo por triplicado el siguiente experimento; a un reactor por lotes, de 250 mL, se le adicionó suficiente inóculo, previamente pretratado, para obtener una concentración de 15 g/L y se aforó a 150 ml con agua destilada. Este

reactor se operó durante 17 días bajo las siguientes condiciones de operación: 35 °C, 90 rpm de agitación y 5.5 de pH. Durante estos días se determinó el H.

Por otro lado, se determinó la capacidad del inóculo y los RSO mezclados para generar hidrógeno bajo el siguiente experimento que se realizó por triplicado; a un reactor por lotes, descrito al inicio de este capítulo, se le adicionó suficiente inóculo previamente pretratado hasta obtener una concentración de 15 g/L y se aforó hasta 150 ml con RSO de concentración de 19 gSV/L. Dicho reactor se operó durante 12 días bajo las siguientes condiciones de operación: 35 °C, 90 rpm de agitación y 5.5 de pH. Durante estos días se monitoreó el H.

Por último para obtener la curva del H que representa el PBGH₂ de los RSO, al H del inóculo y los RSO mezclados se le restó la producción específica del inóculo solo.

4.4 Operación del reactor continuo de tanque agitado productor de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos

4.4.1 Arranque del reactor continuo de tanque agitado

El arranque del RCTA productor de hidrógeno se realizó en cuatro fases. En la primera se activó el inóculo en una solución de glucosa. Durante la segunda etapa se aclimató el inóculo activado a los RSO en un reactor secuencial por lotes (SBR por sus siglas en inglés). Por último, en la tercera fase se estabilizó el RCTA hasta llegar a régimen permanente. Enseguida se presentan a detalle los procedimientos realizados en cada fase.

➤ Activación del inóculo

El inóculo se activó durante 48 h en un reactor secuencial por lotes (SBR por sus siglas en inglés) con ciclos de 12 h bajo las siguientes condiciones de operación: 5.5 de pH, condiciones mesofílicas (35°C), 90 rpm de agitación y atmósfera de nitrógeno.

La activación se realizó en un medio con las siguientes concentraciones por litro de agua: 15 g de inóculo pretratado, 15 g de glucosa, 0.3 g de K₂HPO₃, 0.4 g de NH₄Cl, 0.02 g de

MgCl, 0.0004 g de MnCl, 0.02 g de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002 de $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.002 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.002 g de H_3Bo_4 , 0.002 g de $\text{NiCl}_2\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.002 de ZnCl. Después de las 48 horas, la solución con el inóculo activado se dejó sedimentar durante tres horas y se eliminó la fase líquida de la fase sólida por decantación. La fase sólida se alimentó al SBR durante el arranque.

➤ **Operación en modo SBR**

El RCTA se arrancó en modo secuencial por lotes durante dos ciclos de 24 h con las siguientes condiciones de operación; 35 °C, 24 h de TRH, 5.5 de pH, 2% de ST, 90 rpm de agitación y atmosfera de nitrógeno.

Durante el primer ciclo, el reactor secuencial por lotes se alimentó con RSO en fase húmeda con una concentración de 2% de ST y con el inóculo previamente activado. En el primer ciclo se eliminó el 40% del digestato y en el segundo se rellenó con RSO al 2% de ST.

➤ **Estabilización en régimen continuo.**

Después del término del segundo ciclo de operación del SBR, se cambió el modo de operación a régimen continuo hasta que se alcanzó el estado estacionario. Las condiciones de operación utilizadas son las siguientes: 24 h de TRH, 19 g de $\text{SV}/\text{L}_{\text{reactor}}/\text{d}$ de CO, 35 °C, 5.5 de pH, 1.7 L de volumen de reacción y 1.7 L/d de flujo de alimentación y descarga.

4.4.2 Estrategia de operación en régimen continuo

Para determinar el efecto que tiene la CO sobre la producción de H_2 a partir de RSO en un RCTA, se empleó la siguiente estrategia de operación; se consideró la TPH_2 como una función de una sola variable que es la CO. A su vez la CO es una función de la concentración inicial del sustrato (S_0) y el TRH (ver ecuación. 16), si se mantiene constante la S_0 se tiene que la CO es una función exclusivamente del TRH. Con base en

lo anterior, se determinó la TPH₂ con 3 niveles de CO 19, 38 y 57 h como se presenta en la tabla 14.

Tabla 14. Estrategia de operación experimental

TRH	CO
(h)	(g SV/L _{reactor} /d)
24	19
12	38
8	57

Las condiciones de operación fueron 35 °C, 5.5 de pH, 90 rpm de agitación y 19 gSV/L de concentración de sustrato inicial. Durante la operación se monitoreo la producción de biogás y la composición de H₂, CH₄ y CO₂, utilizando el método de desplazamiento de líquido y cromatografía de gases respectivamente, así también se determinó la composición de humedad ST, SV, DQO, carbohidratos, proteínas y pH al digestato.

4.5 Técnicas analíticas

4.5.1 Acondicionamiento de las muestras

Debido a que algunas técnicas analíticas requieren aplicarse sobre muestras en fase líquida, es necesario realizar suspensiones de los RSO (húmedos y secos) en agua y, a partir de éstas, diluir hasta obtener muestras que presenten concentraciones dentro del intervalo de medición de las curvas de calibración. Por estos motivos se utilizó un método consistente para la preparación de dichas diluciones.

Se tomaron 10 g de la muestra de RSO molida (tamaño menor a 5 mm) o 10 ml del digestato del RCTA y se mezclaron con 900 ml de agua destilada. La mezcla se homogenizó durante 3 minutos mediante una licuadora industrial y se determinó el volumen de la mezcla para cálculos posteriores. Posteriormente, a partir de la suspensión de residuos previamente preparada se realizaron diluciones, cuya concentración, del parámetro a determinar, se ajustó a las necesidades particulares de cada prueba experimental para estar dentro de los límites de solubilidad, concentración o absorbancia que sean detectables y significativos.

4.5.2 Sólidos totales y sólidos volátiles

La concentración de ST y SV de los RSO y del inóculo se cuantificó por gravimetría acorde a los procedimientos descritos en los métodos estándar (APHA, 2005).

4.5.3 Demanda Química de Oxígeno

Para cuantificar la DQO se utilizó el método Hach 435. Este consiste de unos tubos de ensaye preparados con una solución estándar (dicromato de potasio, ácido sulfúrico, plata y mercurio) para determinar la DQO en un rango de 0 a 15000 mgDQO/L. La lectura del valor de DQO se realizó en un espectrofotómetro portátil Hach DR/2010 a una longitud de onda de 620 nm.

4.5.4 Cuantificación de carbohidratos

La cuantificación de carbohidratos se realizó por el método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois *et al.*, (1956), para el cual, se utilizó glucosa como estándar. Dicho método consistió en colocar en un tubo de ensaye 0.5 mL de la muestra, 0.5 mL de fenol al 5% (v/v) y finalmente 2.5 mL de ácido sulfúrico 98% (v/v), se dejó reaccionar durante 20 min. Finalmente, la concentración se determinó en un espectrofotómetro portátil Hach DR/2010 a una longitud de onda de 490 nm.

4.5.5. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas contenidas en los RSO en bruto, el inóculo seco y el digestato se realizó por el método descrito por Lowry *et al.* (1951). Se utilizó albúmina bovina como proteína estándar. Dicho método es colorimétrico de valoración cuantitativa. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer.

Este método consiste en la reacción de las proteínas con el ion Cu^{2+} en medio alcalino para formar un complejo con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Seguido

de la reacción de reducción del reactivo de Follín por los grupos fenólicos residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador.

4.5.6 Composición del biogás

La composición del H₂, CH₄ y CO₂ en el biogás se determinó por cromatografía de gases. La muestra de 10 mL completamente seca se tomó del sistema medición de biogás con una jeringa de 20 mL.

La muestra de 2mL se inyectaba a un cromatógrafo de gases SRI 8610 equipado con un detector de conductividad térmica y dos columnas empacadas en acero inoxidable (6' x 1/8" sílica gel y 6' x 1/8" corte molecular 13X). Las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron a 90 y 150 °C, respectivamente. La temperatura inicial de la columna de 4°C se mantuvo durante 4 minutos y después se incrementó hasta 110 °C con una velocidad de 20°C/min. La temperatura final de la columna se mantuvo durante 3 minutos. Se usó nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 20 mL/min.

4.5.7 Cuantificación de la composición de AGVs y etanol

La concentración de los AGVs (acético, propiónico, butírico, valérico, isobutírico isovalérico) y el etanol se determinaron por cromatografía de gases. La muestra diluida tomada del interior del RCTA se centrifugó a 30000 rpm durante 10 min, después la fase líquida se filtró con una membrana de celulosa de 2.5 µm, el filtrado se colectó en un frasco vial de 2 ml y se acidificó con HCl 2N hasta pH 4 antes de pasar al cromatógrafo de gases.

La muestra acidificada se hizo pasar por un cromatógrafo de gases Varían 3300 equipado con un detector de ionización por flama y una columna capilar (longitud 15 m, diámetro interno 0.53 mm Zebron ZB-FFAP, Phenomenex). La temperatura del inyector y del detector se mantuvo a 190 °C y 210 °C, respectivamente. La temperatura de la columna se mantuvo a 45 °C durante 1.5 min y se incrementó hasta los 135 °C a una tasa de 8 °C/min. Se usó nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 9.5 mL/min.

4.5.8 Análisis biológico de comunidades microbianas

Las comunidades microbianas se analizaron de muestras obtenidas durante la operación del RCTA productor de H₂ a diferentes niveles de CO. Para dicho análisis se utilizó la técnica de electroforesis en gel del gradiente desnaturizante (DGGE por sus siglas en inglés) amplificando segmentos del gen 16sRNA. Este análisis fue relacionado con los cambios en las comunidades microbianas con la producción de H₂.

La extracción del ADN, la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y DGGE se realizó como se describe en un estudio realizados por (Hernández-Mendoza *et al.*, 2014). Los cebadores universales para los dominios Bacteria (46F and 534R) y Arquea (25F and 1492R) se utilizaron como se describe en (Hernández-Mendoza *et al.*, 2014; Valenzuela-Encinas *et al.*, 2014). La DGGE se analizó con el software PAST para obtener el índice de similitud de Ochiai-Barkman's (Hammer *et al.*, 2001).

5. Resultados

5.1 Caracterización fisicoquímica del inóculo pretratado

Después del pretratamiento del lodo granular anaerobio proveniente de la industria cervecera, se obtuvo un inóculo en polvo color gris, con olor a alquitrán y un tamaño de partícula menor a 5 mm (ver figura 12).



Figura 12. Inóculo pretratado

Los resultados de la caracterización del inóculo se presentan en la tabla 15. El inóculo tiene una concentración de 80% de SV, 1410 g/kg de DQO y 276.7 g/kg de proteínas.

Tabla 15. Caracterización fisicoquímica del inóculo

Parámetro	Valor
ST (%)	90.4 ± 0.2
SV (%)	80.0 ± 0.2
DQO (g/kg)	1410 ± 70
Carbohidratos (g/kg)	39.2 ± 4.5
Proteínas (g/kg)	276.7 ± 4.4

5.2 Muestreo y caracterización física *in situ* del sustrato

Para obtener una muestra representativa de los RSO generados en el restaurante, se realizó un muestreo compuesto durante siete días donde se determinaron las siguientes propiedades físicas: la generación, peso volumétrico y la composición.

En dicho restaurante se generó a diario un promedio de 48 kg de RSO (en un rango de 32 a 75 kg/d), con un peso volumétrico promedio de 676 kg/m³ (en un rango de 586 a 762 kg/m³) (ver figura 13). El peso volumétrico de los RSO indica una tendencia a estar por encima de los valores promedios del valor típico de residuos de comida húmedos, datos presentados por Tchobanoglous y Theisen, 1994.

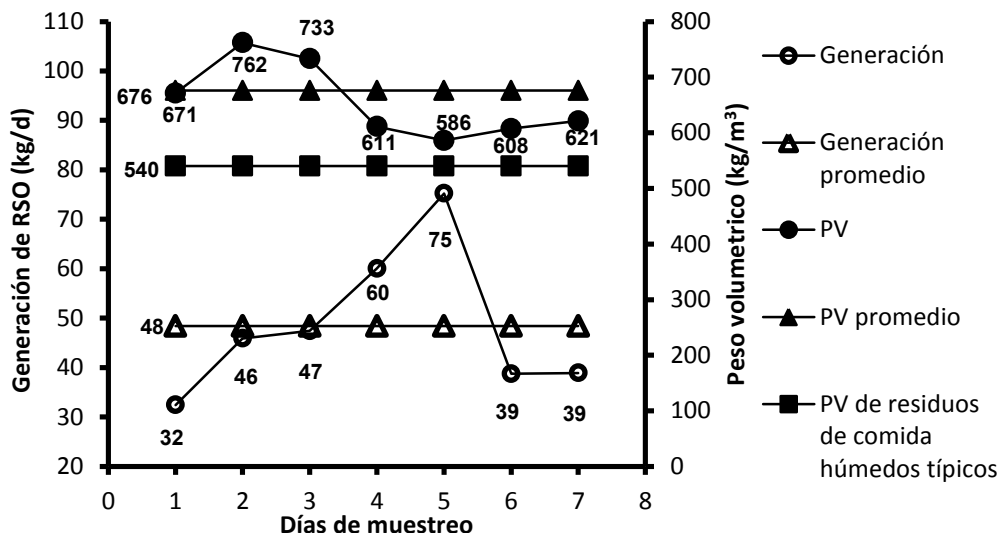


Figura 13. Generación y peso volumétrico (PV) de los residuos sólidos orgánicos del restaurante

La composición física promedio de los RSO presentó en mayor proporción residuos de harinas con 30%, cítricos con 21% y otros que puedan ser compostables 22%, los subproductos que se encontraron en menor proporción son los de residuos de frutas y verduras con 17% y cárnicos con 10 % (ver figura 14).

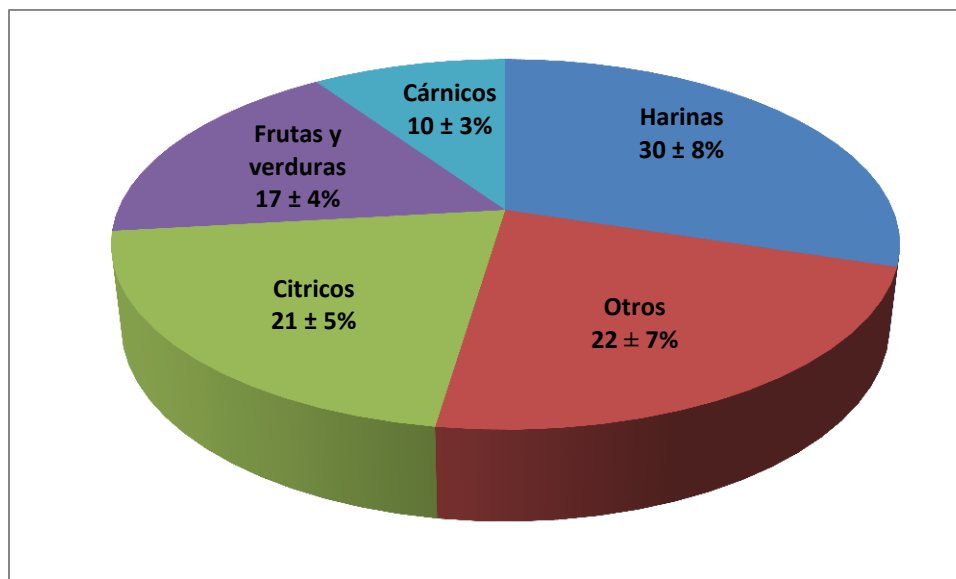


Figura 14. Composición física de los RSO del restaurante

5.3 Caracterización fisicoquímica de los residuos sólidos orgánicos pretratados

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de los RSO generados en el restaurante se presentan en la tabla 16. El contenido de humedad promedio es de 75.7%, el contenido de sólidos es el siguiente; sólidos totales de 24.3%, sólido volátiles de 20.8% y sólidos fijos de 3.5%. La DQO es de 344 g de O₂/kg de RSO, por su parte el contenido de carbohidratos es de 59.6 g/kg de RSO y proteínas de 108 g/kg de RSO. La densidad es de 1097 g/kg y el pH de 4.4.

Tabla 16. Caracterización física y química de los residuos sólidos orgánicos generados en el restaurante

Parámetro	Unidades	Valor
Humedad	(%)	75.7±4.6
ST	(%)	24.3±4.6
SV	(%)	20.8±0.7
DQO	(g/kg)	344.7±35.3
Carbohidratos	(g/kg)	59.6±2.7
Proteínas	(g/kg)	108.1±8.3
Densidad	(kg/m ³)	1097.6±29.7
pH		4.4±0.01

5.4 Pruebas preliminares de producción de hidrógeno

Los resultados que se obtuvieron de las pruebas preliminares de PH_2 en reactores por lotes fueron conocer: el PBGH_2 de los RSO y el efecto que tiene la CRL sobre la PBH_2 . Los reactores por lotes se operaron durante 17 días, durante esos días se monitoreo la producción acumulada de biogás y la composición del H_2 . En seguida se presentan los resultados obtenidos de estas pruebas preliminares.

5.4.1 Efecto de los residuos de limón sobre la producción de hidrógeno

Como resultados del estudio del efecto de la CRL en la producción de H_2 a partir de RSO de comida se obtuvo el perfil del H, estos datos se ajustaron al modelo cinético de Gompertz modificado (ver figura 15 y tabla 17), una gráfica que describe el comportamiento del H en función de la CRL (ver figura 16), la producción de AGVs y la remoción de SV, DQO carbohidratos y proteínas en función de la CRL (ver figura 17 y ver tabla 18).

El tiempo de latencia duró aproximadamente de 3 a 5 d, la fase exponencial entre 2 y 3 días y en aproximadamente 10 días se alcanzó la etapa de equilibrio (ver figura 15).

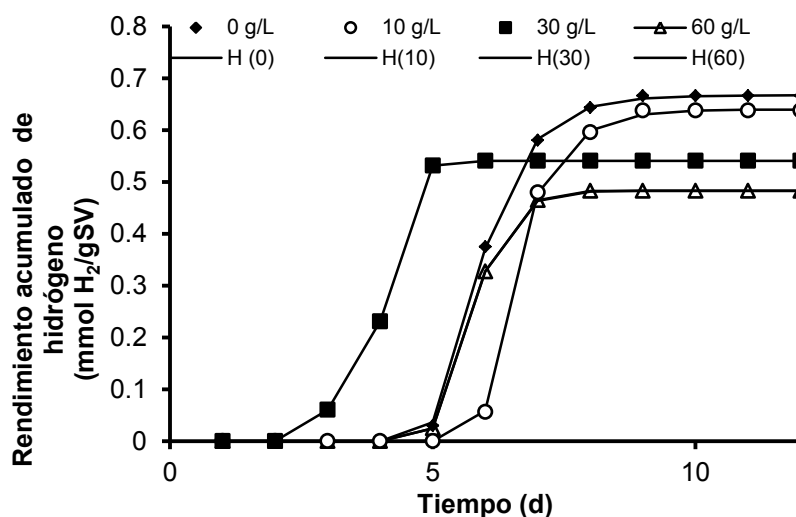


Figura 15. Perfil de rendimiento acumulado de hidrógeno a diferentes concentraciones de residuos de limón

Nota: líneas punteadas datos experimentales, línea continua ajuste de los datos al modelo de Gompertz.

Durante la fase de latencia los microorganismos se adaptaron al sustrato y al sistema, una vez que se adaptaron, se reprodujeron de forma exponencial y comenzaron a consumir el sustrato y a producir H₂ en forma exponencial, esto provocó que el H aumentará. Agotado el sustrato, la tasa de crecimiento de los microorganismos descendió y el H llegó a un punto asintótico.

Tabla 17. Parámetros de la ecuación de Gompertz modificada para los datos de producción de hidrógeno a diferentes niveles de concentración de residuos de limón

CRL (g/L)	λ (d)	H _{max} (mmol H ₂ /g SV)	R _{max} (mmol H ₂ /gSV/d)	TPH _{2max} (mmol H ₂ /L _{reactor} /d)
0	5.18±0.27	0.67±0.03	0.52±0.11	14.31±3.19
10	5.97±0.26	0.64±0.01	0.67±0.08	19.55±2.31
30	3.32±0.95	0.54±0.03	1.01±0.12	32.77±3.93
60	5.29±0.29	0.48±0.03	0.54±0.11	19.97±3.93

Nota: CRL: concentración de residuos de limón, H_{max}: rendimiento acumulado de hidrógeno máximo, R_{max}: tasa de producción específica de hidrógeno máxima, λ : tiempo de latencia, TPH_{2max}: tasa de producción de hidrógeno máxima

Por otro lado, la CRL presenta un efecto negativo en el rendimiento acumulado de hidrógeno (ver figura 18 y tabla 16). El H es linealmente dependiente de la concentración de los residuos de limón. La ordenada al origen representa el H_{max} (0.67±0.03 mmol H₂/gSV), por otro lado, la pendiente representa la velocidad con la que disminuye el H_{max} conforme aumenta la concentración de los residuos de limón.

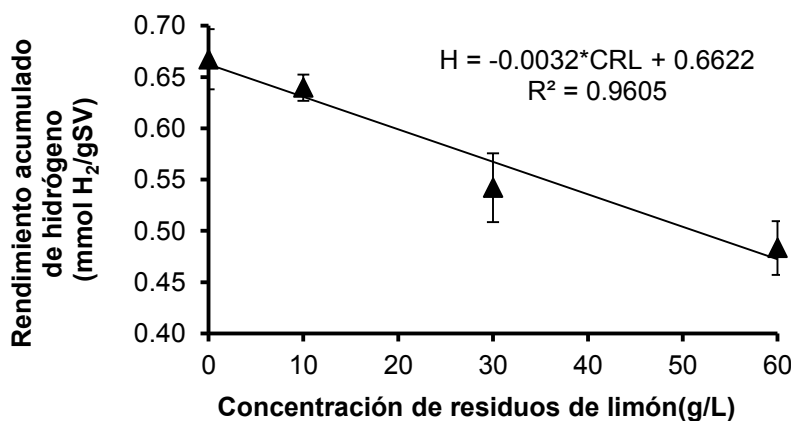


Figura 16. Rendimiento acumulado de hidrógeno en función de la concentración de los residuos de limón

Con base en el ajuste lineal que se presenta en la figura 16, se predice, que el aumento en 10 g/L en la CRL provoca un descenso del 5% en el H y que a concentraciones mayores a 190 g/L la H es nula.

En el caso de la producción de los principales metabolitos de la FO. La concentración de los metabolitos totales incrementa en forma lineal con el incremento de CRL. Los metabolitos que se producen en mayor proporción son el ácido acético, propiónico y butírico. La distribución de estos metabolitos no presenta una dependencia de la CRL (ver figura 17). La relación concentración B/A (mol/mol) se encontró en un rango de 0.4 a 0.7 (ver tabla 18).

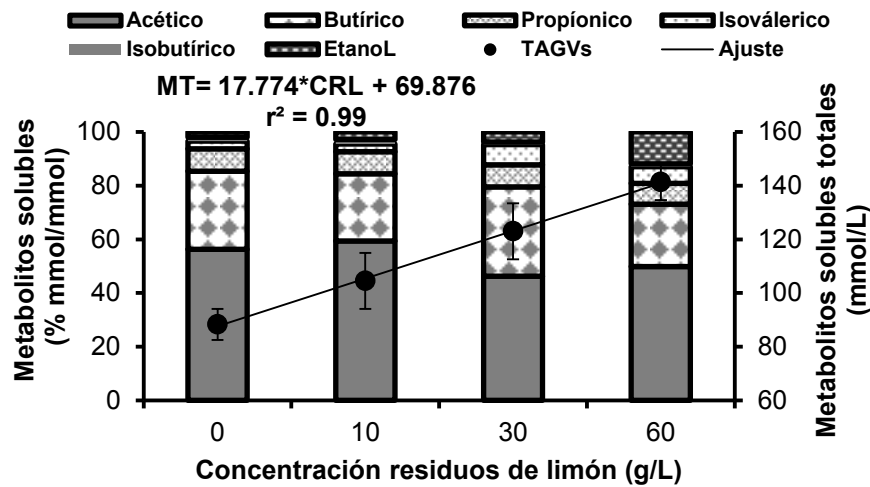


Figura 17. Metabolitos solubles en función de la concentración de residuos de limón

Por su parte, el etanol se produce en menor proporción, su concentración y su distribución aumentan conforme aumenta la CRL. Esto es debido que al incrementar la CRL la reacción de producción del etanol se favorece cada vez más. Esta reacción tiene la desventaja que consume sustrato soluble y genera CO₂ (ver ecuación 14). El incremento en la producción de CO₂ provoca un descenso de la composición del H₂ en el biogás y en el H. Por otro lado, el consumo de sustrato provoca un aumento en la remoción de carbohidratos y sólidos volátiles (ver tabla 18).

Tabla 18. Parámetros de operación, remoción y composición de metabolitos a diferentes niveles de concentración de residuos de limón

Concentración Residuos de limón	0 g/L	10 g/L	30 g/L	60 g/L
H (mmol H ₂ /gSV)	0.67±2.2	0.64±0.03	0.54±0.01	0.48±0.03
Remoción ST (%)	22.3±9.7	33.4±10.6	41.7±9.0	38.8±2.7
Remoción SV (%)	51.1±9.7	53.4±10.6	51.2±9.0	57.1±2.7
Remoción proteínas (%)	10.0±3.9	15.3±5.7	9.8±3.8	19.8±3.5
Remoción carbohidratos (%)	75.9±6.9	75.5±1.9	73.5±7.0	82.1±4.5
Remoción DQO (%)	20.9±5.2	24.7±3.4	33.4±2.0	28.6±1.0
Ac. acético (mmol/L)	50±9	60±8	61±1	73±9±
Ac. butírico (mmol/L)	26±4	25±21	44±29	34±9±
Ac. propiónico (mmol/L)	7±1	8±1	11±1	11±1
Ac. isoválerico (mmol/L)	3±1	3±1	10±4	9±3
Ac. isobutírico (mmol/L)	1±0	2±0	1±0	2±0
Etanol (mmol/L)	2±0	3±0	5±0	17±2
Total de metabolitos (mmol/L)	88±6	105±10	123±10	141±7
B/A (mol/mol)	0.52±0.01	0.42±0.36	0.71±0.46	0.46±0.07

En el caso de la remoción de ST, SV, DQO y proteínas no dependen de la CRL, por otro lado, la remoción de los carbohidratos incrementa con el incremento de la CRL. Los SV se remueven en un rango de 57 a 60%. La remoción de carbohidratos (80%) es mayor que la de proteínas (25%). La remoción de la DQO obtenida (15%) es menor a la teórica de (33%).

5.4.2 Potencial bioquímico de generación de hidrógeno

Para la prueba del PBGH₂ de los RSO de cafetería se operaron reactores por lotes de 250 mL por 12 días. Durante este tiempo, se monitoreo el perfil del H y la composición de H₂ (ver figura 18), después, los datos del perfil del H se ajustaron al modelo cinético de Gompertz modificado (ver tabla 19).

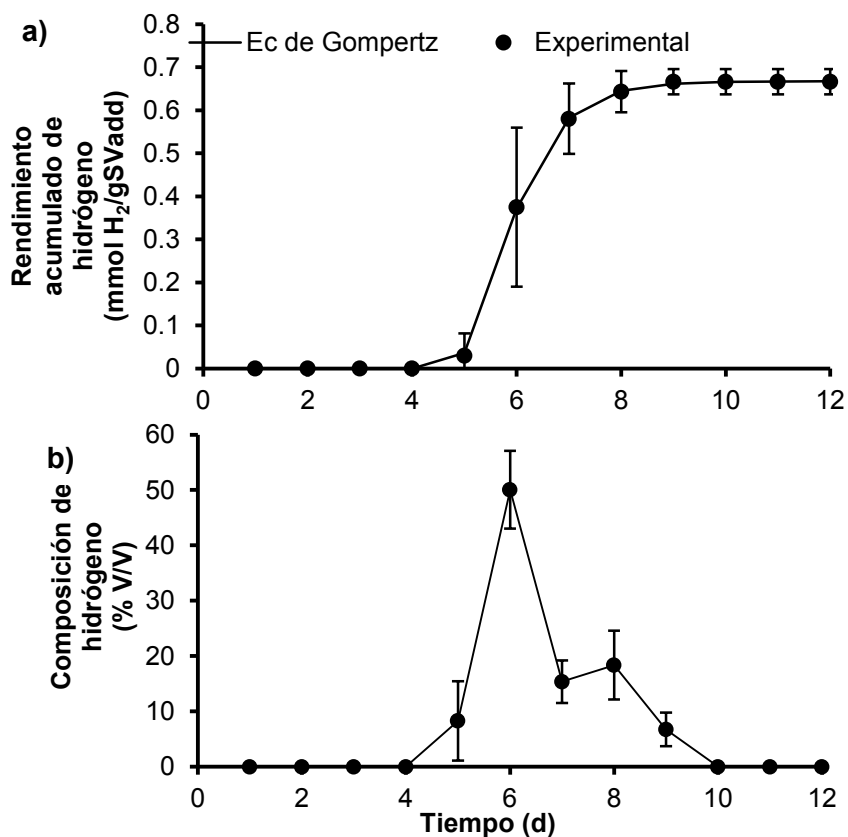


Figura 18. Perfil de rendimiento acumulado (a) y composición de hidrógeno en la prueba de potencial bioquímico de generación de hidrógeno (b)

El H_{max} fue de 0.67 ± 0.03 mmol H₂/gSV, con una TPH_{2max} de 14.3 mmol H₂/L_{reactor}/d y un tiempo de latencia de (λ) o fase de adaptación de los microorganismos a los RSO de aproximadamente 5.18 ± 0.27 d. La fase exponencial duró entre 3 a 4 días y en aproximadamente 10 días se alcanzó el estado de equilibrio. La composición máxima de H₂ en el biogás fue de $50 \pm 7\%$ v/v. Durante la operación no se detectó la presencia de CH₄ en el biogás.

Tabla 19: Parámetros cinéticos de la ecuación de Gompertz modificada en la prueba de potencial bioquímico de generación de hidrógeno

λ (d)	H_{max} (mmol H ₂ /g SV)	R_{max} (mmol H ₂ /gSV/d)	TPH_{2max} (mmol H ₂ /L/d)	r^2
5.18 ± 0.27	0.67 ± 0.03	0.52 ± 0.22	14.3 ± 1.9	0.99

Nota: R_{max} : tasa de producción específica de H₂ máxima, λ : tiempo de latencia, TPH_{2max} : tasa de producción de hidrógeno máxima

En la tabla 20, se presenta una comparación del PBGH₂ de diferentes sustratos (principalmente residuos de comida) presentados en la literatura. El H_{max} y la TPH_{2max} obtenidos experimentalmente en el presente trabajo se localizan en un valor intermedio comparado con otros trabajos de la literatura. El rendimiento varió en un rango de 0.3 a 1.2 mmol H₂/gSV y la TPH₂ en un rango de 14 a 102 mmol H₂/L_{reactor}/d. Estas diferencias se deben principalmente a las diferentes características de los sustratos, al tipo de inóculo, al pretratamiento del inóculo y a las diferentes condiciones de operación.

En general, la cinética de producción de H₂ a partir de RSO obtenida en este trabajo es más lenta que los reportes de la literatura, donde se presentan tiempos de latencia entre 0 y 48 h, fase exponencial de 0 a 12 h y estado de equilibrio entre 24 y 74 h (Kumar y Lin, 2013; Ming *et al.*, 2008 y kim *et al.*, 2009). Esta diferencias pueden ser causadas, principalmente, por que durante la experimentación no se agregaron nutrientes (como nitrógeno, fosforo entre otros) a los reactores, como en los trabajos mencionados.

Tabla 20. Comparación del potencial bioquímico de generación de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos en reactores por lotes

Sustrato	Inóculo	Pretratamiento del inóculo	T °C	pH	SV g/L	λ h	YH (mmol/gSV)	TPH ₂ (mmol/L/d)	Referencias
RC	Lodo acidogénico anaerobio	No	35	4.5	10	18	3.13	20	Shin <i>et al.</i> , 2004
RCO	Microorganismos contenidos en los RC	Térmico (60 °C, 20 min)	35	5	117	9.6	1.2	102	Kim <i>et al.</i> , 2009
RC	Lodo granular anaerobio	Térmico (100 °C, 24 h)	35	5.5	90	0	0.8	N.M.	Ramos <i>et al.</i> , 2012
RC	Estiércol de vaca	Térmico (100 °C, 20 min)	37	5.5	31.4	N.M	0.45	N.M.	Bansal <i>et al.</i> , 2013
RJ	Lodo de una PTAR	No	35	6.5	200	6.7	0.3	28	Kumar y Lin, 2013
RC	Lodo granular anaerobio	Térmico (100 °C, 24 h)	35	5.5	19.2	115	0.67	14	Este estudio

RC: residuos de comida, RJ: residuos de Jatropha, RCO: residuos de cocina y PTAR: Planta de tratamiento de agua residual.

En el caso de la producción de los principales metabolitos de la FO AGVs y etanol (ver tabla 21), los metabolitos que se produjeron en mayor proporción son el ácido acético (57%), el ácido butírico (29%) y el ácido propiónico. El metabolito que se produjo en menor proporción fue ácido isobutírico (1.4%). La relación B/A fue de 0.52 ± 0.01 .

Tabla 21: Producción de metabolitos en la prueba de potencial bioquímico de generación de hidrógeno

Metabolitos	Composición (mmol/L)	Composición (%)
Ac acético	50±9	57.0
Ac butírico	26±4	29.5
Ac propiónico	7±1	8.4
Ac isovalérico	3±1	2.8
Ac isobutírico	1±0	1.4
Etanol	2±0	2.1
Total	88±6	100
B/A (mol/mol)	0.52±0.01	

Nota: B/A es la relación entre la concentración del ácido butírico entre el ácido acético.

El hecho de que los ácidos: acético, butírico y propiónico fueron los metabolitos que se produjeron en mayor proporción, demuestra que las reacciones de formación de estos ácidos durante la FO presentan mayor actividad en relación con las reacciones de formación de los ácidos isovalérico, isobutírico y etanol (ver ecuaciones 10, 11, y 14). Sin embargo, como la relación B/A es menor a 1 indica que también se favorece la reacción de formación del ácido acético a partir de H_2 y CO_2 catalizada por bacterias homoacetogénicas (ver ecuación 13).

Este resultado está acorde con la investigación de Motte *et al.*, 2013, quien encontró que a concentraciones menores de 19% de SV se obtenían relaciones A/B menores a 1 y encontró que esto se debía a que se favorecía la reacción de formación del ácido acético a partir de H_2 y CO_2 catalizada por bacterias homoacetogénicas. Algunas de las especies de bacterias homoacetogénicas que han sido mayormente estudiadas para la producción de H_2 a partir de RSO son: *Clostridium butiricum*, *Acetobacterium woodii* entre otras (Almeida *et al.*, 2011).

En el caso de la remoción de ST y SV fue de $22.3 \pm 0.05\%$ y $51.1 \pm 0.3\%$ respectivamente. La remoción de carbohidratos ($76 \pm 6.86\%$) fue mayor que la de proteínas Los

carbohidratos se remueven en mayor cantidad debido a que se favorece la actividad de los microorganismos que hidrolizan los carbohidratos para obtener aminoácidos (ver tabla 22).

Tabla 22. Remoción de sólidos totales, sólidos volátiles, demanda química de oxígeno, carbohidratos y proteínas en la prueba potencial bioquímico de generación de hidrógeno

Parámetro	Remoción (%)
ST	22.3±0.05
SV	51.1±0.3
Carbohidratos	76±6.8
Proteínas	10±3.7
DQO	21±3.8

5.5 Arranque y operación del reactor continuo de tanque agitado productor de hidrógeno

La activación del inóculo se realizó con glucosa durante tres días en un reactor por lotes. La producción acumulada de hidrógeno fue de 35.4 mmol. En esta fase únicamente bacterias fermentativas que utilizan a la glucosa como sustrato fueron activadas, bacterias hidrolíticas no fueron activadas.

Después de la activación, el inóculo se aclimató a los RSO como sustrato. Para esto se operó el reactor en modo SBR durante dos ciclos de 24 h. En el primer y segundo ciclo se produjeron 6.5 mmol de H₂ por ciclo. Una vez finalizado el segundo ciclo se cambió la operación a régimen continuo.

5.5.1 Perfil de la tasa de producción, composición y rendimiento de hidrógeno

El RCTA productor de H₂ operó durante 186 días. Del día 1 al 80 operó con una CO de 19 gSV/L_{reactor}/d y un TRH de 24 h, del día 81 al 134 con una CO de 38 gSV/L_{reactor}/d y un TRH de 12 h y finalmente del día 135 al 186 operó con una CO de 57 gSV/L_{reactor}/d y un TRH de 8 h. En la figura 19 se presenta el perfil de composición, TPH₂ y YH durante la operación en régimen continuo.

Durante los primeros nueve días de operación, el H₂ se produjo en baja cantidad (0.2±0.12 mmol H₂/L_{reactor}/d). Este periodo fue la fase de adaptación de los microorganismos (ver figura 19). Esta baja producción de H₂ puede estar relacionada con el cambio de régimen de operación de modo SBR a RCTA. Bakonyi *et al.*, (2014) han discutido que el TRH, el pH y la temperatura aplicada durante el estado de transición del reactor (causada por el cambio de operación de lotes a continuo) tendrá como resultado el enriquecimiento de ciertas poblaciones microbianas.

Entre el día 10 al 21 la TPH₂, la composición y el YH incrementaron en promedio hasta 3.8±1.1 mmol H₂/L_{reactor}/d, 22±6% v/v y 0.3±0.2 mmol H₂/gSV_{add} respectivamente. Sin embargo, durante este tiempo una capa de lípidos sólida se acumuló dentro del reactor entre la superficie del digestato y el espacio de cabeza.

La capa de lípidos provocó un descenso en la transferencia de masa del digestato (en fase líquida) al biogás, lo que a su vez causó el aumento de la presión parcial del H_2 en la fase líquida. El aumento de la presión parcial, acorde con Almeida *et al.*, (2011), causó la inhibición de los de los microorganismos fermentadores productores de hidrógeno y el descenso drástico de la TPH_2 , la composición y el YH entre el día 21 al 25.

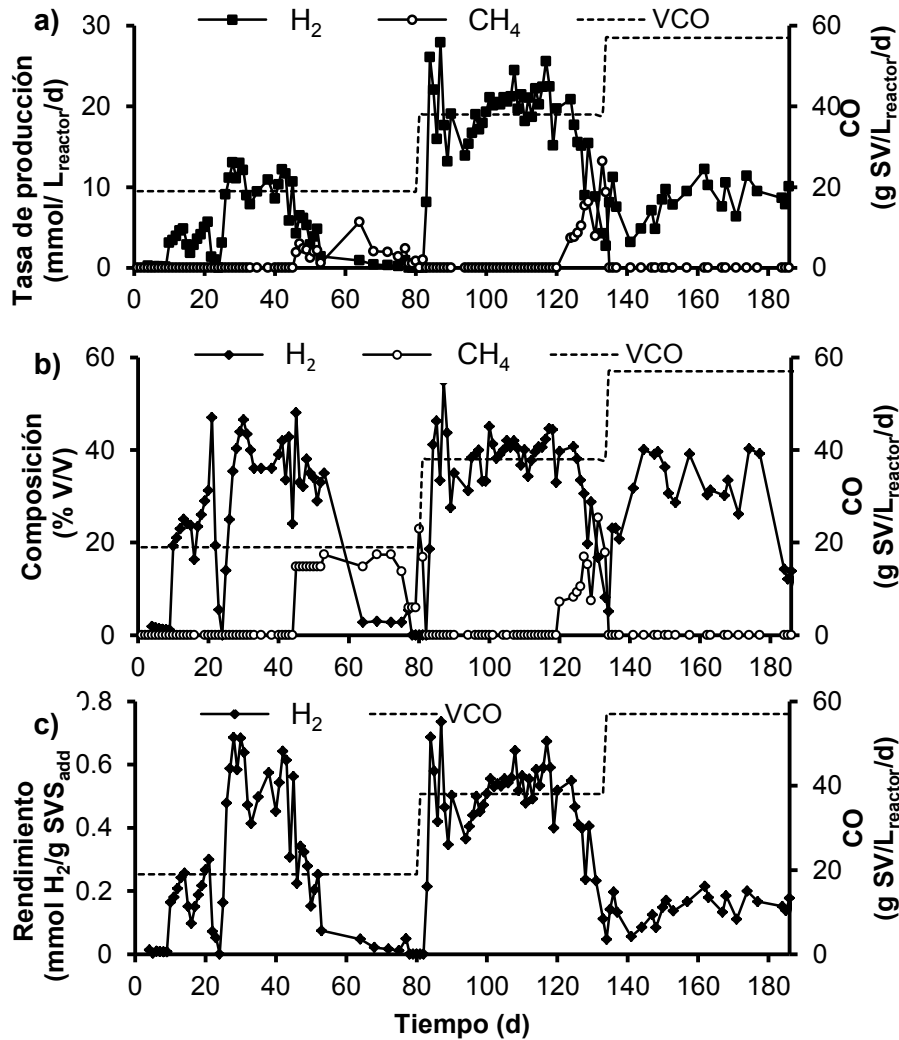


Figura 19. Perfil de la tasa de producción (a), composición (b) y rendimiento de hidrógeno (C)

En el día 24 se removió la capa de lípidos acumulada en el interior del reactor. En la posterior operación para evitar la acumulación de lípidos dentro del RCTA, a los RSO en fase líquida utilizados como sustrato se le removieron los lípidos con una trampa de

grasas. La formación de la capa de lípidos no se volvió a observar durante la operación del reactor.

La formación de esta capa de lípidos y otras fallas prácticas (ejemplo fallas en las bombas, incrustación de los tubos, entre otras) se deben evitar con el fin de tener una producción óptima de H_2 . Para reducir al mínimo este tipo de fallas y aumentar la TPH_2 el desarrollo de estrategias de control y el uso de diferentes configuraciones de reactor (SBR, Semi-RCTA, entre otros.) pueden ser una buena opción (Kumar *et al.*, 2013; Bakonyi *et al.*, 2014).

A partir del día 25 al 45 el reactor mostró una TPH_2 , composición y YH de 10.68 ± 1.6 mmol $H_2/L_{\text{reactor}}/d$, 39.34% v/v y 0.6 mmol H_2/gSV_{add} . Durante el día 46 al 80 se detectó la presencia de CH_4 en el biogás con una composición promedio de $13.6 \pm 3.9\%$ v/v (ver figura 18 b), por otro lado se observó el descenso de la composición de H_2 hasta 0.5 mmol $H_2/L_{\text{reactor}}/d$. La presencia de CH_4 en el biogás indica la existencia de arqueas metanogénicas en el medio de reacción. Acorde con Valdez y Poggi, (2009) las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas consumen H_2 para generar CH_4 , esto explica el descenso de la composición, TPH_2 , YH entre los días 46 al 80.

En el día 81 se incrementó la CO a 38 gSV/ L_{reactor}/d y a la vez se disminuyó el TRH a 12 h. Estos cambios en las condiciones de operación causaron el un aumento en la TPH_2 , la composición de H_2 y la supresión en la generación de CH_4 . Este resultado está acorde con un trabajo de Pakarinen *et al.*, (2011) donde reportaron que el aumento de la CO resulto en un aumento de la TPH_2 desde 0 a 8.3 mmol $H_2/L_{\text{reactor}}/d$ y un descenso en la generación de CH_4 de 18 a 0 mmol $CH_4/L_{\text{reactor}}/d$. Es decir, se logró cambiar las condiciones de producción de CH_4 a las de producción de H_2 con el aumento de la CO.

Este comportamiento puede ser atribuido a diferentes fenómenos, que pueden incluir al lavado y reducción de la actividad de los microorganismos metanogénicos, control biocinético o selección de bacterias fermentativas productoras de H_2 . (Buitrón *et al.*, 2014).

Entre el día 84 al 120 la TPH_2 , la composición y el YH se mantuvieron en forma estable en un promedio de 19.8 ± 1.6 mmol $H_2/L_{\text{reactor}}/d$, 39.1 % v/v y 0.5 mmol H_2/gSV_{add}

respectivamente. Sin embargo, del día 126 al 136 se volvió a detectar la presencia de CH₄ con una composición promedio de 10% v/v (ver figura 18). La presencia de CH₄ provocó un descenso en la TPH₂.

En el día 135 se aumentó la CO a 57 g SV/L_{reactor}/d y se disminuyó el TRH a 8 h. Dicho cambio provocó un descenso en la tasa de producción de CH₄ y un aumento en la TPH₂. Entre el día 145 al 186 el RCTA operó sin la producción de CH₄ y con un valor promedio de TPH₂, composición y YH de 8.92±1.9 mmol H₂/L_{reactor}/d, 35.9±4.4% v/v y 0.17±0.03 mmol H₂/gSV_{add}, respectivamente.

Cuando no se detectó la presencia de CH₄ en el biogás, la composición de H₂ tuvo una variación en un rango entre 25 y 55% v/v independientemente de la CO (ver figura 22). Estos cambios en la composición de H₂ están acorde con resultados de la literatura donde se utiliza RSO como sustrato. Zhu *et al.* (2008), Wang y Zhao (2009) y Shin *et al.* (2005), reportan una composición de H₂ en el biogás en un rango entre 36 a 58, 28 a 33 y 45 a 62% v/v, respectivamente, cuando RSO se utilizaron como sustrato en un RCTA.

5.5.2 Perfil de remoción de sólidos volátiles, demanda química de oxígeno, carbohidratos y proteínas.

Durante la operación del RCTA se monitoreo el perfil de eficiencia remoción SV, DQO, carbohidratos y proteínas (ver figura 20 a y b). La eficiencia de remoción de SV y DQO fue de 51±9 y 27±9% respectivamente durante la operación del RCTA. La variación de la eficiencia de remoción del sustrato y la TPH₂ durante el tiempo puede estar relacionada con la velocidad de hidrólisis de sustratos insolubles y la velocidad de degradación de los polímeros complejos (carbohidratos, lípidos proteínas) la cual depende de la concentración del sustrato (Wang y Zhao, 2009).

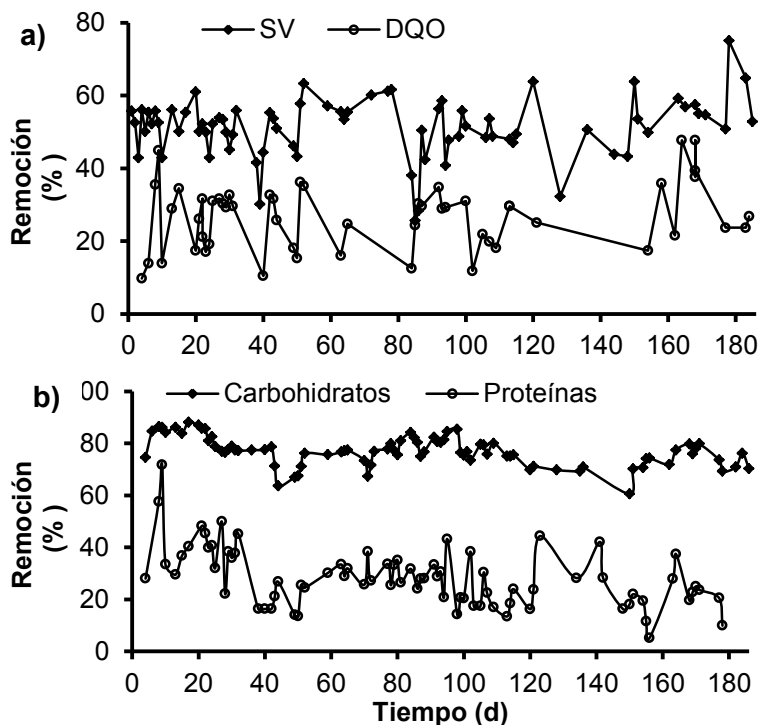


Figura 20. Perfil de remoción de sólidos volátiles, demanda química de oxígeno (a) carbohidratos y proteínas (b).

La eficiencia de remoción de carbohidratos totales ($76\pm 6\%$) fue más grande que la eficiencia de remoción de proteínas ($28\pm 11\%$) independientemente de la CO (ver figura 20 b). En el caso de los RSO, los carbohidratos aportan más a la producción biológica de H_2 comparados con las proteínas y los lípidos. En este sentido, las proteínas se pueden hidrolizar en el reactor fermentativo, pero el biogás que produce se compone mayoritariamente de CO_2 . Se ha reportado que únicamente 0.1% de la carne sin grasa se convierte en hidrógeno, basado en la remoción de DQO en experimentos por lotes (Okamoto *et al.*, 2000).

5.5.3 Perfil de producción de los principales metabolitos de la fermentación oscura

El perfil de producción de los principales metabolitos de la FO (AGVs y etanol) se presenta en la figura 21. El metabolito que se produjo en mayor proporción fue el ácido acético (1317 ± 535 mg/L), representa el 48% del total de los metabolitos producidos durante la operación del RCTA. Por su parte, el ácido butírico se produjo en un rango de 300 a 1200 mg/L.

La producción total de ácido propiónico fue de 556 ± 330 mg/L. Durante algunos días de operación a una CO de $57 \text{ gSV/L}_{\text{reactor/d}}$, el ácido propiónico se produjo en más alta concentración que el ácido acético. Esto puede estar relacionado con la caída de la TPH_2 , ya que metabólicamente hablando las bacterias que producen ácido propiónico consumen H_2 para producir ácido propiónico (Motte *et al.*, 2011). Los ácidos isovalérico e isobutírico fueron producidos en menor concentración, excepto entre los días 64 al 86.

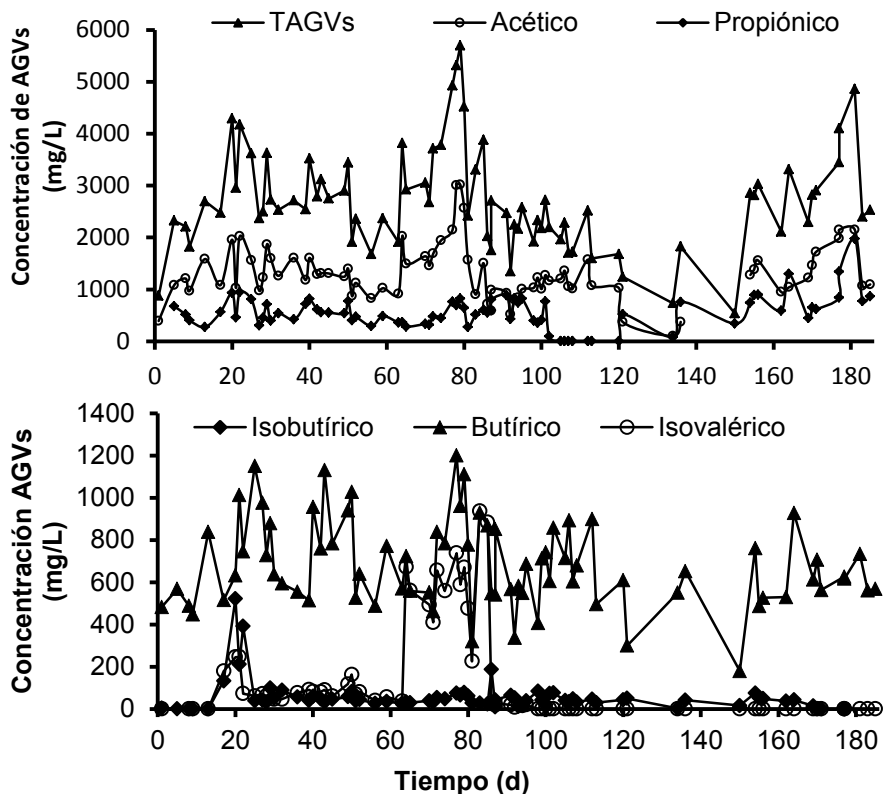


Figura 21. Perfil de concentración de los ácidos grasos volátiles

5.5.4 Efecto de la carga orgánica sobre la producción de hidrógeno

Para el análisis del efecto de la CO sobre la PBH_2 se utilizaron datos de la operación en forma estable del reactor, es decir cuando la TPH_2 en un tiempo mayor a 15 días varió con una desviación estándar menor a 15% de la TPH_2 promedio.

➤ **Efecto de la carga orgánica sobre tasa la producción, composición y rendimiento de hidrógeno**

En la figura 22 se presenta la TPH_2 , YH y composición del H_2 en función de la CO. Se observó que el incremento de la CO de 19 a 38 gSV/L_{reactor}/d ocasionó un aumento considerable de la TPH_2 de 10.7 a 19.9 mmol H_2 /L_{reactor}/d y se encontró que estos datos son estadísticamente diferentes (ANOVA, $p < 0.05$). Por otro lado, el incremento de la CO de 38 a 57 gSV/L_{reactor}/d provocó un descenso de la TPH_2 de 19.87 a 8.92 mmol H_2 /L_{reactor}/d, también se encontró que los datos son estadísticamente diferentes (ANOVA, $p < 0.05$).

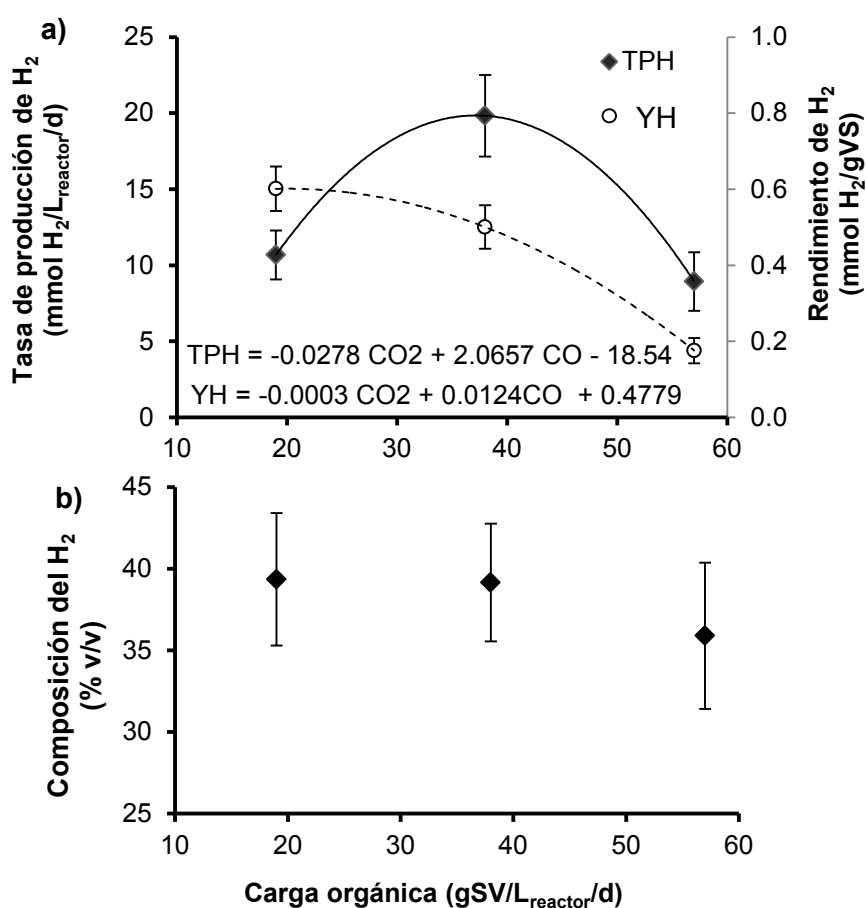


Figura 22. Tasa de producción, rendimiento (a) y composición de hidrógeno en función de la carga orgánica (b)

Por otro lado, el incremento de la CO provocó un efecto negativo en el YH (ver figura 21 a). Este resultado está acorde con resultados de la literatura donde se reporta que el

incremento de la CO causa un descenso del YH. Este descenso en el rendimiento puede ser resultado del incremento de la producción de metabolitos totales (ver tabla 24).

Los datos experimentales de TPH_2 y YH a diferentes CO fueron ajustados a los polinomios de segundo orden de las ecuaciones 20 y 21.

$$TPH_2 = -0.0278 * CO^2 + 2.0657 * CO - 18.54 \quad \text{Ecuación 20}$$

$$YH = -0.0003 * CO^2 + 0.0124 * CO + 0.4779 \quad \text{Ecuación 21}$$

Donde, la TPH_{2max} (19.8 mmol $H_2/L_{reactor}/d$) se obtuvo a una CO de 37.1 gSV/ $L_{reactor}/d$, y YH_{max} (0.6 mmo H_2/gSV) se obtuvo a una CO de 19.2 gSV/ $L_{reactor}/d$. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Hafez *et al.*, (2010), donde a partir de glucosa como sustrato encontraron la TPH_{2max} y el YH_{max} a una misma CO. Estas diferencias pueden ser explicadas por las diferentes características de los sustratos.

Debido a que la TPH_{2max} y el YH_{max} no se encuentran a la misma CO, es necesario, hacer un compromiso al decidir cuál de estos dos parámetros se va maximizar. Como en este estudio el sustrato utilizado (RSO) es de bajo costo (comparado con la glucosa) es más conveniente operar el reactor a la TPH_{2max} con una reducción del 13% en el YH_{max} .

En la literatura, se ha reportado que la TPH_2 aumenta con el aumento de la CO hasta que alcanza un valor máximo a una determinada CO cuando se utiliza glucosa como sustrato (Ramírez *et al.*, 2015; Hafez *et al.*, 2010). Durante la fermentación de la glucosa Hafez *et al.*, (2010) establecieron una relación entre la TPH_2 y el YH con la CO y obtuvieron la TPH_{2max} y el YH_{max} a una CO de 103 gDQO/ $L_{reactor}/d$.

En el caso de los RSO, diferentes autores reportan la máxima TPH_2 a diferentes CO. Zahedi *et al.*, (2014) reportaron la TPH_{2max} a 110 gSV/ $L_{reactor}/d$ de CO, mientras que Wang y Zhao (2009) encontraron la TPH_{2max} a 37.8 gSV/ $L_{reactor}/d$ de CO esta diferencias puede estar relacionadas con el pretratamiento del inóculo, diferencias características de los RSO y a las particulares condiciones de operación.

Cuando no se detectó la presencia de CH_4 en el biogás, la composición del H_2 no presentó dependencia estadísticamente significativa de la CO y varió en un rango de 35 al

40% v/v independiente de la CO (ver figura 25). Zhu *et al.*, (2008), Wang y Zhao (2009) y Shin *et al.*, (2005) reportaron que la composición del H₂ en el biogás varía en un rango de 36 a 58, 28 a 33 y 45 a 62% v/v respectivamente, cuando RSO fueron usados como sustrato en reactores continuos.

En la tabla 23 se presenta una comparación de los resultados de PH₂ obtenidos en esta tesis con resultados obtenidos por otros autores en reactores continuos de tanque agitado. La TPH₂ y el YH se encuentran en un valor intermedio cuando se trabaja en condiciones mesofílicas. Los más altos YH y TPH₂ fueron obtenidos en condiciones termofílicas. Es interesante notar que el uso de recirculación del digestato puede incrementar la TPH₂, comparado con otros estudios con similares condiciones de operación y sin recirculación (Chu *et al.*, 2008).

Tabla 23. Comparación de la producción de hidrógeno a diferentes condiciones de operación en reactores continuos

Sustrato	Pretratamiento del inóculo	T (°C)	pH	TRH (d)	CO (gVS/L/d)	H ₂ (% v/v)	TPH ₂ (mmol H ₂ /L/d)	YH (mmol H ₂ /gVS _{add})	Referencias
Residuos de comida	No	55	5.5	5	8	60.5	41.4	5.2	Shin y Youn, 2005
Residuos de comida	Digestato adaptado	55	4.8	1.3	39.4	54.5	234	5.9	Chu <i>et al.</i> , 2007*
Residuos de comida /estiércol	Digestato adaptado	55	6.5	8	14.1	1.2	9.7	0.68	Karlsson <i>et al.</i> , 2008
Residuos de comida	No	40	5.5	4	37.7	2.4	75.4	2.0	Wang y Zhao, 2009**
Residuos orgánicos domésticos	No	37	5.5	2	37.5	42.0	66.7	1.8	Liu <i>et al.</i> , 2006*
Pasto silado	Control biocinético	35	5.6	6	10	24	17.0	1.7	Pakarienen <i>et al.</i> , 2011
Pulpa de oliva	Térmico	35	5.0	0.3	179.4	29.1	14.3	0.08	Koutrouli <i>et al.</i> , 2009
Residuos de comida	Térmico (90°C, 10 min)	35	5.3	1.25	35.2	--	35.2	1.0	Kim <i>et al.</i> , 2008
Residuos de comida	Térmico (90°C, 20 min)	35	5.5	3	37.6	--	16.52	0.4	Jo <i>et al.</i> , 2007
Residuos de comida	Térmico (105°C, 24 h)	35	5.5	0.5	38.0	39	19.8	0.5	Esta tesis

Nota: Inóculo fue lodo anaerobio para todos los casos excepto para Wang y Zhao, 2009 donde se utilizó microorganismos que se encuentran en los residuos de comida. * Recirculación del digestato. ** Operación en semicontinuo.

5.5.5 Efecto de la carga orgánica sobre la producción de los principales metabolitos de la fermentación oscura

La producción y distribución de los principales metabolitos de la FO con diferentes niveles de CO se presentan en la tabla 24 y figura 23. La producción y distribución de los metabolitos presentaron dependencia de la CO. La producción total de metabolitos aumentó de forma lineal con el aumento de la carga orgánica. La relación B/A presentó dependencia cuadrática de la CO.

En general, los metabolitos que se produjeron en mayor proporción fueron los siguientes: ácido acético (33-42% mol/mol), etanol (25-39% mol/mol), ácido butírico (13-16% mol/mol) y ácido propiónico (14-18% mol/mol). Estos cuatro metabolitos corresponden a más del 98% de la producción de metabolitos totales. La relación B/A (mol/mol) se encuentra en un rango entre 0.26-0.41. El ácido acético, etanol y ácido butírico se producen por reacciones de fermentación de carbohidratos las cuales generan H₂ y CO₂ y que son catalizadas por diferentes bacterias fermentativas (ver ecuaciones 10, 11, y 14). Por su parte, el ácido propiónico se produce por su reacción de formación, la cual consume H₂ (ver ecuación 12).

Tabla 24. Producción de metabolitos de la fermentación oscura a diferentes niveles de carga orgánica

Metabolitos de la FO	OLR (gSV/L _{reactor} /d)		
	19	38	57
Metabolitos totales (mmol/L)	57±10	60±14	67±8
Ac. Acético (mmol/L)	23±4	19±3	24±7
Etanol (mmol /L)	14±3	23±9	7±1
Ac. Butírico (mmol /L)	9±3	8±3	7±1
Ac. Propiónico (mmol/L)	8±3	8±3	11±4
Ac. Isobutírico mmol /L)	1±0	1±0	0±0
Ac. Isovalérico (mmol /L)	1±0	0±0	0±0
B/A (mol/mol)	0.40±0.12	0.41±0.07	0.26±0.12

Como las relaciones B/A son menores a 1 y como el ácido acético se produce en mayor cantidad, esto sugiere, que también se favoreció la reacción de formación de ácido acético por la ruta homoacetogénica, que también consume H₂ (ver ecuación 13). Estos resultados están de acuerdo con Motte *et al.*, (2013) quien obtuvo a concentraciones de 10 y 14% de ST relaciones B/A de 0.4 y 0.8, respectivamente y discuten que estos

resultados se deben a que se favoreció la reacción de formación del ácido acético por la ruta homoacetogénica.

El ácido acético (42%) fue el metabolito predominante a la CO de 19 gSV/L_{reactor}/d seguido del etanol (28%). Sin embargo, al aumentar la CO a 38 gSV/L_{reactor}/d, en el caso del biogás aumentó la TPH₂ y el caso del digestato descendió la composición de ácido acético e incremento la producción de etanol. Esto indica que al aumentar la CO se suprime la reacción de formación del ácido acético por la ruta homoacetogénica y se favorece la de formación de etanol, esto provocó el aumento de la TPH₂ y el aumento en la composición del etanol.

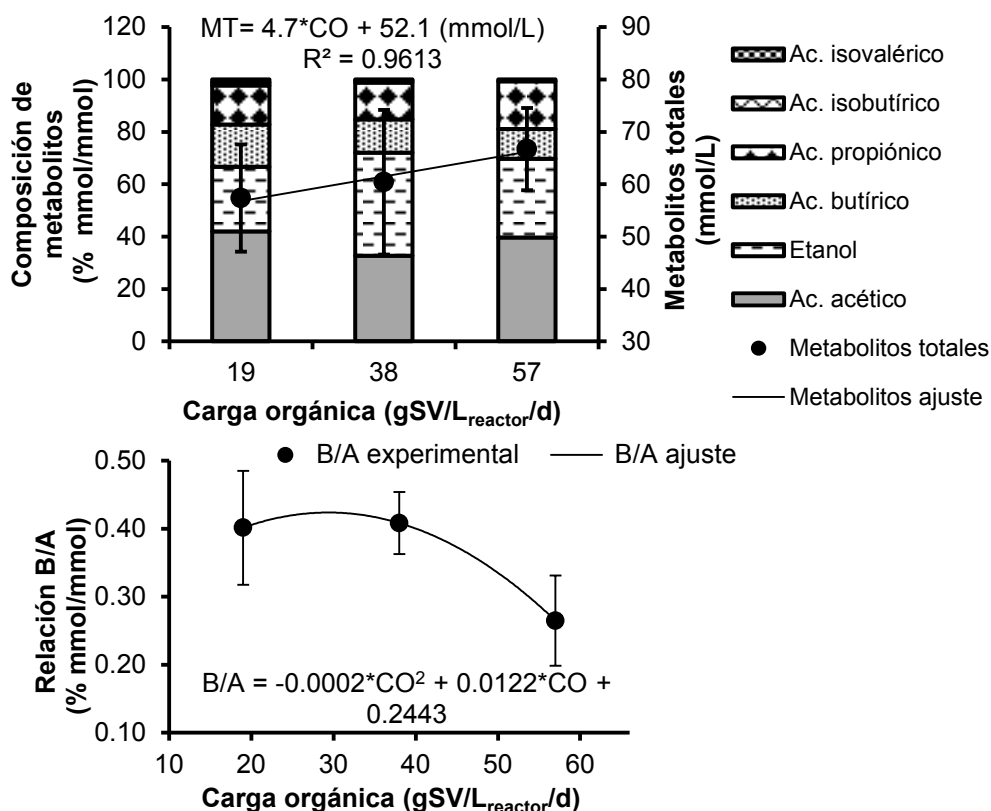


Figura 23. Producción, distribución de los metabolitos (a) y relación B/A en función de la carga orgánica (b)

Al aumentar la CO hasta 57 gSV/L_{reactor}/d la TPH₂ descendió y el metabolito predominante fue el ácido acético seguido del etanol. Este resultado, posiblemente es a causa de que al aumentar la CO la reacción de formación del etanol se suprime y la reacción de formación del propiónico por la ruta homoacetogénica, otra vez se favorece.

5.5.6 Efecto de la carga orgánica sobre la remoción de sólidos totales, sólidos volátiles, demanda química de oxígeno, carbohidratos y proteínas.

En la tabla 25 se presenta la remoción de ST, SV, DQO, carbohidratos y proteínas. Se observa que la remoción de ST (44-48%), SV (53-58) y carbohidratos (74-99%) no presentaron diferencia estadísticamente significativa al aumentar la CO (ANOVA $p < 0.05$), por lo tanto, estos parámetros no dependen de la CO. Por otro lado, la remoción de DQO y proteínas disminuyeron con el incremento de la CO.

En el caso de los carbohidratos Koutrouli *et al.*, (2009) reportaron que la remoción de carbohidratos descendió (de 96 a 65%) con el incremento de la CO de 43 a 92 gVS/L_{reactor}/d. Considerando que en este estudio la CO máxima fue de 57 gSV/L_{reactor}/d, estos resultados pueden ser complementarios. Sin embargo, es necesario realizar experimentos variando la CO en un rango más amplio (ejemplo de 6 a 140 gVS/L_{reactor}/d) para clarificar el comportamiento de la remoción de carbohidratos al incrementar la CO.

Tabla 25. Parámetros de operación y remoción con diferentes niveles de carga orgánica

Parámetros	CO (gVS/L _{reactor} /d)		
	19	38	57
TPH ₂ (mmol H ₂ /L _{reactor} /d)	10.68±1.6	19.83±2.7	8.92±1.9
YH (mmol H ₂ /gVS)	0.61±0.06	0.5±0.06	0.18±0.03
Hidrógeno (% v/v)	39±4.1	39±3.6	35±4.5
Remoción de ST (%)	44.4±8.0	47.4±8.3	48.3±8.3
Remoción de SV (%)	50.4±8.9	53.5±8.0	54.4±7.9
Remoción de DQO (%)	26.3±7.6	23.4±6.7	19.8±3.3
Remoción de Carbohidratos (%)	79.1±6.9	75.8±3.1	74.23±3.7
Remoción de Proteínas (%)	37.6±7.7	21.9±5.2	19.9±6.6

La remoción de carbohidratos (74-79%) es mayor que la de proteínas (19-37%), lo cual indica que el H₂ se forma principalmente por la degradación de carbohidratos. Estos resultados concuerdan con los reportados por Chu *et al.*, (2008) quien en un RCTA productor de H₂ a partir de residuos de comida obtuvo una remoción de carbohidratos y proteínas de 90 y 37%.

Como la remoción de DQO está en un rango de 19 a 26%, la FO (por sí sola) no es un proceso técnicamente viable para tratamiento de RSO, incluso, si se obtuviera la remoción teórica del 33%, la remoción de DQO seguiría siendo un valor muy bajo y el digestato al final del proceso contendría una alta cantidad de carga orgánica. Este

digestato si llega a sitios de disposición final causará más contaminación que el RSO sin tratamiento.

Sin embargo, si la FO se acopla con otros procesos ya probados industrialmente, como la digestión anaerobia se puede lograr que se remueva más cantidad de DQO (80%) y por otro lado aumentar el rendimiento energético. Liu *et al.* (2006) demostraron que al acoplar la FO con la DA se produce un efecto sinérgico en el rendimiento energético, es decir que si se acopla la FO y la DA el rendimiento energético de este sistema es mayor que la suma del rendimiento energético que produce cada uno de estos sistemas por separado. Sin embargo, esto no sucedió con la remoción de DQO.

5.5.7 Análisis de comunidades microbianas

Se realizó un análisis de DGGE en muestras tomadas del interior del RCTA en diferentes días de operación. El perfil de Bacterias y Arqueas se presentan en la figura 24. El análisis DGGE presentó un índice de similitud mayor a 0.72 independiente de la CO en ambos casos.

Como se presenta en la figura 24 (A), se detectaron 14 bandas relacionadas con bacterias. Dichas bandas se presentaron desde el primer día de operación y permanecieron durante toda la operación, sin embargo, solo siete se encontraron en mayor proporción. La presencia de dichas bandas está relacionada, entre otras bacterias, con bacterias productoras de H₂ y con la producción de hidrógeno en el biogás.

Por otro lado, en los días que la tasa de producción y rendimiento de hidrogeno fueron muy bajos también se detectaron estas bandas. Sin embargo, es necesario hacer más estudio para poder identificar las bandas que se relacionan con bacterias productoras de hidrógeno y determinar su actividad específica en el reactor.

Para el caso de arqueas, entre el día 1 al 34 la DGGE muestra una muy baja presencia. Sin embargo, para el día 46 algunas bandas aparecieron y permanecieron durante toda la operación. La presencia de dichas bandas está relacionado con la presencia de arqueas en el reactor y con la generación de CH₄ en el biogás.

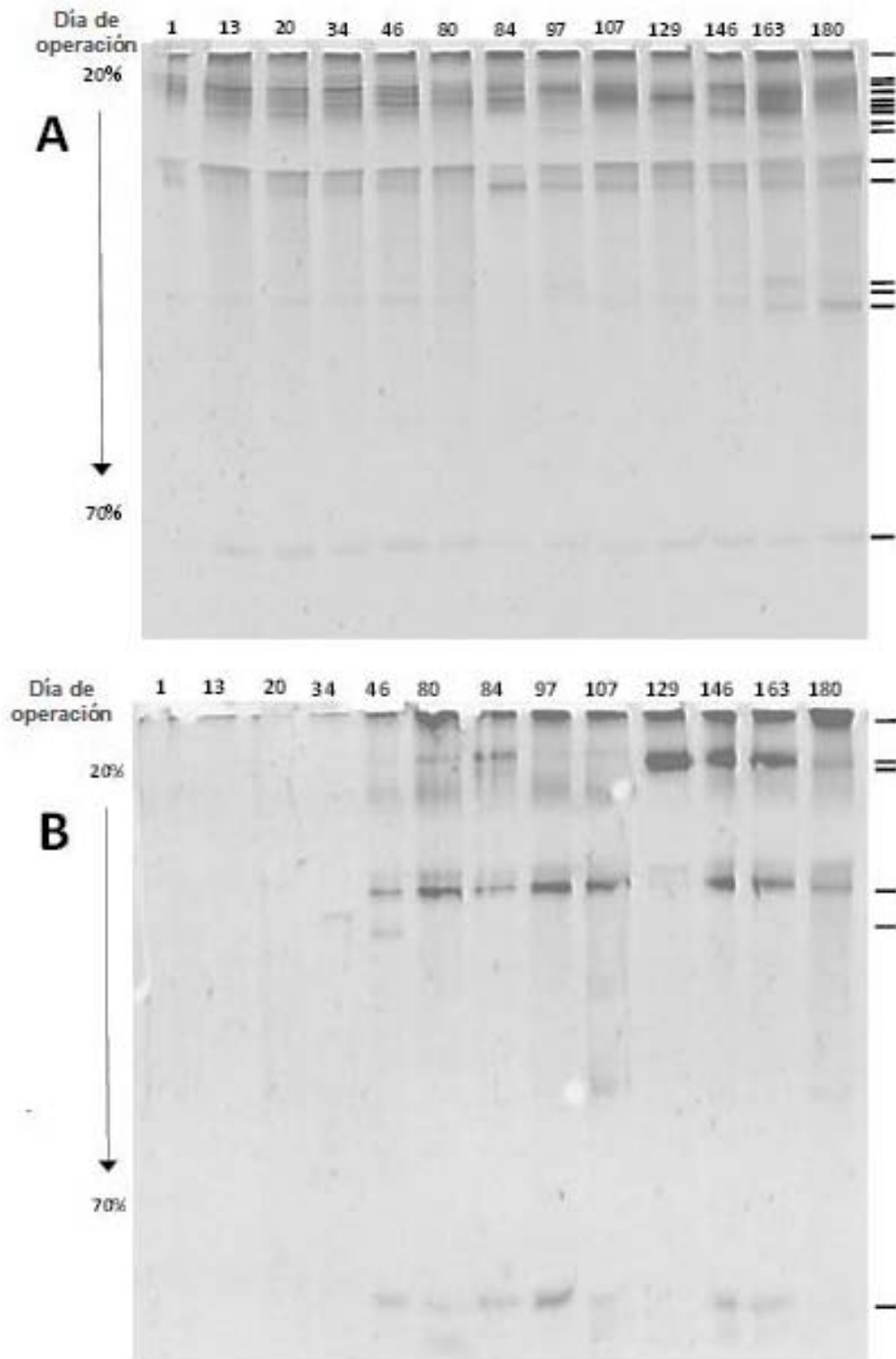


Figura 24. DGGE de las muestras durante la operación del reactor continuo de tanque agitado. Perfiles de DGGE para dominio Bacterias (A) y Arqueas(B): Cada carril está relacionado con diferentes días de muestreo.

Las arqueas permanecen en el reactor a partir del día 46 al 180. Sin embargo, entre el día 81 al 120 y entre el día 133 al 186 no se detectó la presencia de CH₄ en el biogás. Dicha presencia sin la producción de CH₄ se puede explicar por la baja actividad de arqueas en el reactor, pero es necesario realizar más estudios con el fin de analizar la actividad específica de estos microorganismos en interior del reactor. Además, se ha informado de que la alteración de la CO, es también una fuente de estrés para las cepas que se ven obligadas a acostumbrarse a su nuevo entorno en reactores continuos de producción de H₂ (Bakonyi *et al.*, 2012).

Los microorganismos contenidos en la alimentación de los RSO pueden conducir a cambios en la composición microbiana en el interior del reactor. Se ha reportado que se pueden reducir estos cambios al controlar la temperatura de alimentación (Jo *et al.*, 2007). En este estudio, la temperatura de alimentación fue controlada a 4°C para evitar la actividad fermentativa durante el almacenamiento. Sin embargo, arqueas metanogénicas fueron detectadas durante la operación del reactor, por lo tanto es importante identificar si las arqueas metanogénicas provienen del sustrato alimentado o del inóculo.

6. Conclusiones

Como conclusión general se demostró que la carga orgánica tiene efecto sobre la producción biológica de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos de restaurante en un reactor continuo de tanque agitado debido a que la tasa de producción y el rendimiento de hidrógeno presentaron dependencia cuadrática de la carga orgánica, por otro lado, la remoción de demanda química de oxígeno y remoción de proteínas descendieron con el aumento de la carga orgánica

La caracterización de los residuos sólidos orgánicos de restaurante mostró que estos tienen un alto potencial para ser utilizados como sustrato en la fermentación oscura por su gran capacidad de generación (48 ± 15 kg/d), por su alto contenido de nutrientes como son carbohidratos (59.6 ± 2.7 g/L) y proteínas (108.1 ± 8.5 g/L) y por su alto contenido de materia orgánica (208 ± 0.7 gSV/kg). Por otro lado, la caracterización del lodo granular anaerobio pretratado mostró que dicho lodo por su alto contenido de proteínas (276.7 ± 4.4) presentó un alto potencial para ser utilizado como inóculo.

En el caso del efecto de la concentración de los residuos de limón sobre la producción biológica de hidrógeno se encontró que al aumentar gradualmente la concentración de los residuos de limón el rendimiento acumulado de hidrógeno descendió de forma lineal. El descenso en el rendimiento acumulado de hidrógeno está relacionado con el aumento en la producción y con la distribución de los principales metabolitos (ácido acético, propiónico, butírico y etanol).

La producción de metabolitos aumento de forma lineal con el aumento de la concentración de los residuos de limón, y la distribución de los metabolitos dependió de la concentración de residuos de limón. El incremento de la concentración de los residuos de limón provocó que se favorecieran reacciones que consumen el hidrógeno y las que forman solventes (las cuales consumen sustrato y producen bióxido de carbono).

Después de la prueba de potencial bioquímico de generación de hidrógeno de los RSO utilizados como sustrato se determinó que el rendimiento acumulado de hidrógeno fue de 0.61 ± 0.03 mmol H₂/gSV con una TPH₂ de 14.3 ± 1.9 mmol H₂/L_{reactor}/d y la composición máxima de hidrógeno en el biogás fue de $50 \pm 7\%$ (v/v).

Los metabolitos que se produjeron en mayor proporción fueron el ácido acético, propiónico y butírico. La relación ácido butírico/ácido acético fue de 0.54 ± 0.2 (mol/mol). Estos resultados indican que las reacciones que se presentaron durante la operación de los reactores por lotes fueron las de formación del ácido acético y propiónico por fermentación de carbohidratos y la formación del ácido acético por la ruta homoacetogénica.

Por otro lado, fue posible producir hidrógeno a partir de RSO en el RCTA con tres niveles de carga orgánica 19, 38 y 57 $\text{gSV/L}_{\text{reactor}}/\text{d}$ con una tasa de producción de hidrógeno de 10.7 ± 1.6 , 19.8 ± 0.6 y 8.9 ± 1.9 $\text{mmol H}_2/\text{L}_{\text{reactor}}/\text{d}$ y un rendimiento de 0.61, 0.50 y 0.18 $\text{mmol H}_2/\text{g SV}$ respectivamente

Se observó que la producción de metabolitos aumentó de forma lineal con el aumento de la carga orgánica. La distribución de los metabolitos no presentó dependencia de la carga orgánica. El ácido acético y el etanol fueron los metabolitos que se produjeron en mayor cantidad. Lo anterior, indica que las reacciones que se llevaron a cabo durante la operación de reactor fueron las de formación del ácido acético y el etanol por fermentación de carbohidratos y la de formación del ácido acético por la ruta homoacetogénica.

La máxima tasa de producción y el máximo rendimiento de hidrógeno no se encontraron a la misma carga orgánica. La tasa de producción de hidrógeno máxima fue 19.8 $\text{mmol H}_2/\text{L}_{\text{reactor}}/\text{d}$ y se obtuvo a una carga orgánica de 37.1 $\text{gSV/L}_{\text{reactor}}/\text{d}$. En el caso del rendimiento de hidrógeno, se obtuvo el valor máximo de 0.61 $\text{mmol H}_2/\text{gSV}$ a una carga orgánica de 20.7 $\text{gSV/L}_{\text{reactor}}/\text{d}$.

6.1 Recomendaciones

Uno de los principales problemas al trabajar con reactores continuos en el laboratorio es mantener el flujo de entrada y salida constantes. Esto puede ser causado por variaciones en el flujo de entrada, incrustaciones de minerales en las mangueras y fugas. Para eliminar estos inconvenientes es necesario desarrollar estrategias de control y evaluar el uso de diferentes configuraciones de reactores como el SBR y reactores semi-continuos de tanque agitado.

En el caso de residuos con alta concentración de lípidos es necesario el uso de una trampa de grasas antes de alimentar el sustrato al reactor continuo. Dicha trampa, al eliminar las grasas, evitará formación de una capa de lípidos en la superficie del digestato en el interior del reactor, la cual puede afectar la producción de hidrógeno.

Por otro lado se recomienda realizar un estudio para determinar el efecto de los lípidos sobre la producción de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos en reactores continuos de tanque agitado. Con los resultados de dicho estudio, se podrían proponer estrategias de control que permitan utilizar los lípidos de la forma más adecuada y práctica.

Otra recomendación es realizar estudios de producción de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos vía fermentación oscura en base seca, es decir, con concentraciones de sólidos totales mayores al 15% con el propósito de disminuir el uso de agua utilizada para dilución y aumentar la tasa de producción y rendimiento de hidrógeno. Para esto es necesaria la utilización de nuevas configuraciones de reactor (como el reactor de flujo pistón y los reactores discontinuos secuenciales), el uso de bombas para transporte de fluidos viscosos (como las bombas de desplazamientos positivo) y el desarrollo de estrategias de control que faciliten la operación del reactor.

Para aumentar el rendimiento energético y la remoción de demanda química de oxígeno del sustrato, se puede acoplar el proceso de fermentación oscura con otros como: la digestión anaerobia, la fotofermentación o la formación de polihidroxicanoatos.

Para incrementar la producción de hidrógeno, será necesario implementar estrategias de control óptimo basadas en la carga orgánica para maximizar la tasa de producción y rendimiento de hidrógeno. La filosofía de dicha estrategia debe basarse en mantener la carga orgánica en un rango donde se encuentra la tasa de producción y rendimiento de hidrógeno máximos por medio de la manipulación del flujo de alimentación.

Por último, para residuos sólidos orgánicos con alto contenido de cítricos es necesario diseñar métodos para remover el mayor porcentaje posible de cítricos y así minimizar el efecto negativo de este sustrato en la producción biológica de hidrógeno vía fermentación oscura.

Bibliografía

- APHA, 1995. American Public Health Association Standar Mehods for the Examination of Water and Wastewater. 21 ed. Washintón D.C.: American Public Health Association
- Almeida, A. Nafarrate-Rivera, E., Alvarado, A., Cervantes-Ovalle A., Luevanos, M.P.E., Oropeza R., Balagurusamy, N., 2011. Expresión genética de la digestión anaerobia: un paso adelante en la comprensión genética de las interacciones tróficas de esta biotecnología. *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 3(6), pp. 14-34.
- Antonopoulou, G., Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Angelopoulos, K., Lyberatos, G., 2008. Biofuels generation from sweet sorghum: Fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresource Technology* 99, 110–119.
- Bakonyi, P., Nemestóthy, N., Simon, V., Bélafi-Bakó, K., 2014. Review on the start-up experiences of continuous fermentative hydrogen producing bioreactors. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 40, 806–813.
- Bedoya, A., Castrillon, J.C., Ramirez, J.E., Vasquez, J.E., Arias Zabala, M., 2008. Producción biológica de hidrógeno: Una aproximación al estado del arte. *Dyna* 75, 137–157.
- Bitton, G., 2005. *Wastewater microbiology*, 3rd ed. ed. Wiley-Liss, John Wiley and Sons, Hoboken, N.J.
- Buitrón G, Hernández-Mendoza C., 2024. Suppression of methanogenic activity in anaerobic granular biomass for hydrogen production. *Chem Technol Biotechnol* 89,143–9.
- Bujanos A., C. & Moreno A., I., 2013. Producción de hidrógeno a partir de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos en un biorreactor discontinuo. *San Luis Potosí, IWA Mexico Young Water*, 1-5.
- Kohl L, Nielsen RB., 1997. *Gas purification*. 5th ed. Houston TX; New York: Gulf publishing Company, 466-470.
- Chong, M.L., Sabaratnam, V., Shirai, Y., Hassan, M.A., 2009. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 3277–3287.
- Chu, C.-F., Li, Y.-Y., Xu, K.-Q., Ebie, Y., Inamori, Y., Kong, H.-N., 2008. A pH- and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 4739–4746.
- Demirel, B., Scherer, P., Yenigun, O., Onay, T.T., 2010. Production of Methane and Hydrogen from Biomass through Conventional and High-Rate Anaerobic Digestion Processes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 40, 116–146.
- DOF. *Ley General para la Prevención y Gestión Integral de Residuos*. México. 2003 (8 de octubre).
- Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S., Xiaoying, K., Yu, Z., 2009. Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 812–820.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, Pa., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry* 28, 350–356.
- Dung, T.N.B., Sen, B., Chen, C.-C., Kumar, G., Lin, C.-Y., 2014. Food Waste to Bioenergy via Anaerobic Processes. *Energy Procedia* 61, 307–312.
- Felder, R. M. y Rousseau, R. W., 2006. *Principios elementales de los procesos químicos*. México: Limusa Wiley, 83-270.
- Gerardi, H., 2003. *The Microbiology of Anaerobic Digester*. Primera ed. New Jersey: Jonh Wiley y Sons, 51-59.
- GIZ, 2012. *Guía de planificación para proyectos de biogás en Chile*. Primera ed. Santiago de Chile: Proyecto de energías renovables., 21-71.

- Edwards, P.P., Kuznetsov, V.L., David, W.I.F., Brandon, N.P., 2008. Hydrogen and fuel cells: Towards a sustainable energy future. *Energy Policy* 36, 4356–4362.
- Escamilla-Alvarado, C., Ponce-Noyola, T., Ríos-Leal, E., Poggi-Varaldo, H.M., 2013. A multivariable evaluation of biohydrogen production by solid substrate fermentation of organic municipal wastes in semi-continuous and batch operation. *International Journal of Hydrogen Energy* 38, 12527–12538.
- Escobar Blanco, M., 2012. Extracción de Compuestos Fenólicos de las Cascaras de Cítricos Producidos en México, 2-68.
- Espina, L., Gelaw, T.K., de Lamo-Castellví, S., Pagán, R., García-Gonzalo, D., 2013. Mechanism of Bacterial Inactivation by (+)-Limonene and Its Potential Use in Food Preservation Combined Processes. *Plos one*, 8, 1-10.
- GIZ, 2012. Guía de planificación para proyectos de biogás en Chile. Primera ed. Santiago de Chile: Proyecto de energías renovables 21-71.
- Gómez, X., Morán, A., Cuetos, M.J., Sánchez, M.E., 2006. The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: A two-phase process. *Journal of Power Sources* 157, 727–732.
- Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., Steyer, J.-P., 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* 35, 10660–10673.
- Hafez, H., Nakhla, G., El Naggar, H., 2010. An integrated system for hydrogen and methane production during landfill leachate treatment. *International Journal of Hydrogen Energy* 35, 5010–5014.
- Hammer O, Harper D, Ryan P. 2001 PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron*;4:1-9.
- Hernández-Mendoza C, Moreno-Andrade I, Buitrón G., 2014. Comparison of hydrogen-producing bacterial communities adapted in continuous and discontinuous reactors. *Int J Hydrog Energy*;39:14234–9.
- INEGI, 2013. Instituto Nacional de Geografía y Estadística. [En línea] Available at: <http://www.inegi.org.mx/>[Último acceso: 18 Octubre 2014].
- Jiménez, B. E., 2001. La contaminación ambiental en México, México D.F.: LIMUSA, 453-506.
- Jo, J.H., Jeon, C.O., Lee, D.S., Park, J.M., 2007. Process stability and microbial community structure in anaerobic hydrogen-producing microflora from food waste containing kimchi. *Journal of Biotechnology* 131, 300–308.
- Kapdan, I.K., Kargi, F., 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology* 38, 569–582.
- Karlsson, A., 2008. Effects of temperature, hydraulic retention time and hydrogen extraction rate on hydrogen production from the fermentation of food industry residues and manure. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 953–962.
- Khalid, A., Arshad, M., Anjum, M., Mahmood, T., Dawson, L., 2011. The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste Management* 31, 1737–1744.
- Kim, D.-H., Kim, S.-H., Shin, H.-S., 2009. Hydrogen fermentation of food waste without inoculum addition. *Enzyme and Microbial Technology* 45, 181–187.
- Kim, S., 2004. Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy* 29, 1607–1616.
- Kim, S.-H., Han, S.-K., Shin, H.-S., 2008. Optimization of continuous hydrogen fermentation of food waste as a function of solids retention time independent of hydraulic retention time. *Process Biochemistry* 43, 213–218.
- Kim, S.-H., Shin, H.-S., 2008. Effects of base-pretreatment on continuous enriched culture for hydrogen production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 5266–5274.

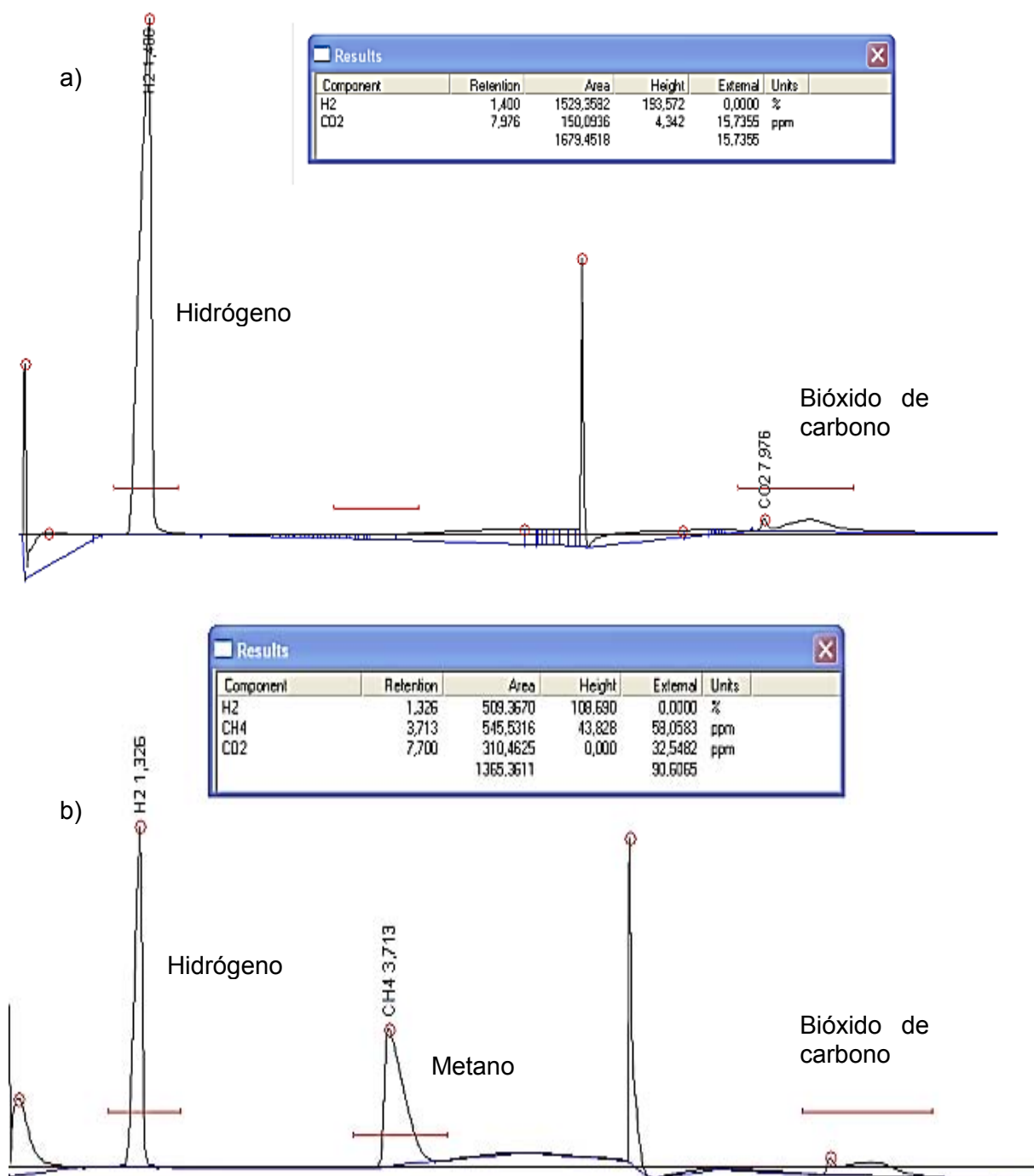
- Kobayashi, T., Xu, K.-Q., Li, Y.-Y., Inamori, Y., 2012. Evaluation of hydrogen and methane production from municipal solid wastes with different compositions of fat, protein, cellulosic materials and the other carbohydrates. *International Journal of Hydrogen Energy* 37, 15711–15718.
- Kotsopoulos, T.A., Fotidis, I.A., Tsolakis, N., Martzopoulos, G.G., 2009. Biohydrogen production from pig slurry in a CSTR reactor system with mixed cultures under hyper-thermophilic temperature (70 °C). *Biomass and Bioenergy* 33, 1168–1174.
- Koutrouli, E.C., Kalfas, H., Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Stamatelatou, K., Lyberatos, G., 2009. Hydrogen and methane production through two-stage mesophilic anaerobic digestion of olive pulp. *Bioresource Technology* 100, 3718–3723.
- Kumar, G., Bakonyi, P., Periyasamy, S., Kim, S.H., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., 2015. Lignocellulose biohydrogen: Practical challenges and recent progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 44, 728–737.
- Kumar, G., Lin, C.-Y., 2013. Bioconversion of de-oiled *Jatropha* Waste (DJW) to hydrogen and methane gas by anaerobic fermentation: Influence of substrate concentration, temperature and pH. *International Journal of Hydrogen Energy* 38, 63–72.
- Lay, J.-J., Lee, Y.-J., Noike, T., 1999. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Research* 33, 2579–2586.
- Li, M., Zhao, Y., Guo, Q., Qian, X., Niu, D., 2008. Bio-hydrogen production from food waste and sewage sludge in the presence of aged refuse excavated from refuse landfill. *Renewable Energy* 33, 2573–2579.
- Lin, C.-Y., Lay, C.-H., Sen, B., Chu, C.-Y., Kumar, G., Chen, C.-C., Chang, J.-S., 2012. Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy* 37, 15632–15642.
- Lin, C.-Y., Wu, S.-Y., Lin, P.-J., Chang, J.-S., Hung, C.-H., Lee, K.-S., Lay, C.-H., Chu, C.-Y., Cheng, C.-H., Chang, A.C., Wu, J.-H., Chang, F.-Y., Yang, L.-H., Lee, C.-W., Lin, Y.-C., 2011. A pilot-scale high-rate biohydrogen production system with mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy* 36, 8758–8764.
- Liu, D., Liu, D., Zeng, R.J., Angelidaki, I., 2006. Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process. *Water Research* 40, 2230–2236.
- Lo, Y., Bai, M., Chen, W. & J., C., 2008. Cellulosic hydrogen production with a sequencing bacterial hydrolysis and dark fermentation strategy. *Cellulosic hydrogen production with a sequencing bacterial hydrolysis and dark fermentation strategy*, 99, 8299–8303.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., others, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275.
- Mata, A., 2003. *Biometanization of the organic fraction of municipal solid waste*. Primera ed. London: IWA publishing, 1-61.
- Moreno A., I. y Buitrón, G., 2011. Influence of particle size on hydrogen production from food waste. Ouro Preto, X Latin-Worshop and symposium of anaerobic digestion, 1-7.
- Motte, J.-C., Trably, E., Escudie, R., Hamelin, J., Steyer, J.-P., Bernet, N., Delgenes, J.-P., Dumas, C., others, 2013. Total solids content: a key parameter of metabolic pathways in dry anaerobic digestion. *Biotechnol Biofuels* 6, 164.
- Müller, J.T., 2000. Direktverstromung flüssiger Energieträger in Brennstoffzellen, *Berichte aus der Chemie*. Shaker, Aachen. 200-300.
- NMX-AA-19-1985. Protección al ambiente - Contaminación del suelo – Residuos sólidos municipales – Peso volumétrico “in situ” (8 de Marzo).
- NMX-AA-22-1985. Protección al ambiente - Contaminación del suelo – Residuos sólidos municipales - Selección y cuantificación de subproductos (8 de Agosto).
- NMX-AA-61-1985 Protección al Ambiente - Contaminación del Suelo-Residuos Sólidos Municipales- Determinación de la Generación. México. 1985 (8 de agosto).

- Okamoto M, Miyahara T., Mizuno O, Noike T, 2000. Biological hydrogen potential of materials characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes. *Water Sci Technol*;41:25–32.
- Ohnishi, A., Bando, Y., Naoshi, F. & Masaharu, S., 2010. Development of a simple bio-hydrogen production system through dark fermentation by using unique microflora. *International journal energy*, Volumen 35, pp. 8844-8553.
- Pakarinen, O., Kaparaju, P., Rintala, J., 2011. The effect of organic loading rate and retention time on hydrogen production from a methanogenic CSTR. *Bioresource Technology* 102, 8952–8957.
- Pandey, A., 2013. *Biohydrogen*. Elsevier Science and Technology, Amsterdam, 259-278.
- Ramírez Morales, J., Torres Zúñiga, I., Buitrón G., 2015. On-line heuristic optimization strategy to maximize the hydrogen production rate in a continuous stirred tank reactor. *Process Biochemistry* 50, 893–900.
- Ramos, C., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Chamyand, R., 2012. Effect of the initial total solids concentration and initial pH on the bio-hydrogen production from cafeteria food waste. *International Journal of Hydrogen Energy* 37, 13288–13295.
- Reith, J.H., Wijffels, R.H., 2003. Bio-methane and bio-hydrogen: status and perspectives of biological methane and hydrogen production. Dutch Biological Hydrogen Foundation, Petten, 103-121.
- Ren, N., Guo, W., Liu, B., Cao, G., Ding, J., 2011. Biological hydrogen production by dark fermentation: challenges and prospects towards scaled-up production. *Current Opinion in Biotechnology* 22, 365–370.
- Runfola, J., Gallardo, A., 2009. Analisis de factores que influyen en la generación y composición de los residuos sólidos urbanos a considerar para un modelo de caracterización. 3º Simposio Iberoamericano de Ingeniería de Residuos, pp. 1-9.
- Tawfik, A., Salem, A., 2012. The effect of organic loading rate on bio-hydrogen production from rice straw waste via mesophilic up-flow anaerobic reactor. *Bioresource Technology*, Volumen 107, pp. 186-190.
- Tchobanglous, G. y Theisen, H., 1994. *Integrated solid waste management*. Primera ed. Singapore: McGraw-Hill.
- Salvatore, A., S. Borkosky, E. Willink and A. Bardón., 2004. Toxic effects of lemon peel constituents on *Ceratitis capitata*. *J. Chem Ecol.* 30: 323-333.
- Shin, H.-S., Youn, J.-H., 2005. Conversion of food waste into hydrogen by thermophilic acidogenesis. *Biodegradation* 16, 33–44.
- Show, K.-Y., Lee, D.-J., Chang, J.-S., 2011. Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresource Technology* 102, 8524–8533.
- Sreethawong T, Niyamapa T, Neramitsuk H, Rangsunvigitt P, Leethochawalit M, Chavadej S., 2010. Hydrogen production from glucose-containing wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor: effects of COD loading rate, nitrogen content, and organic acid composition. *Biochem Eng J.* 160, 322–32.
- Ueno, Y., Fukui, H., Goto, M., 2007. Operation of a Two-Stage Fermentation Process Producing Hydrogen and Methane from Organic Waste. *Environmental Science & Technology* 41, 1413–1419.
- Valdez-Vazquez, I., Poggi-Varaldo, H.M., 2009. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13, 1000–1013.
- Valenzuela-Encinas C, Neria-González I, Alcántara-Hernández RJ, Enríquez-Aragón JA, Estrada-Alvarado I, Hernández-Rodríguez C, Dendooven L, Marsch R., 2008. Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles*;12:247–54.
- Vatsala, T., Raj, S., Manimaran, A., 2008. A pilot-scale study of biohydrogen production from distillery effluent using defined bacterial co-culture. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 5404–5415.

- Wang, X., y Zhao, Y., 2009. A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 245–254.
- Wang, X., Zhou , X., Ren, N., 2009. CFD simulation of an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor for biohydrogen production. *International Journal Hydrogen Energy* , Volumen 32, pp. 9686-9695.
- Zahedi, S., Sales, D., Romero, L.I., Solera, R., 2013. Hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste in anaerobic thermophilic acidogenesis: Influence of organic loading rate and microbial content of the solid waste. *Bioresource Technology* 129, 85–91.
- Zhang, Z., Vriesekoop, F., Yuan, Q., Liang, H., 2014. Effects of nisin on the antimicrobial activity of d-limonene and its nanoemulsion. *Food Chemistry* 150, 307–312.
- Zhao, M.-X., Yan, Q., Ruan, W.-Q., Miao, H.-F., Ren, H.-Y., Xu, Y., 2012. A Comparative Study of Sequential Hydrogen-methane and Independent Methane Production from Kitchen Wastes. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects* 34, 1046–1054.
- Zhu, H., Stadnyk, A., Béland, M., Seto, P., 2008. Co-production of hydrogen and methane from potato waste using a two-stage anaerobic digestion process. *Bioresource Technology* 99, 5078–5084.

Anexos

Anexo 1. Cromatogramas de gases de dos muestras de biogás tomadas del RCTA a) compuesta de H₂ y CO₂ y b) compuesta de H₂, CO₂ y CH₄



Anexo 2. Ecuaciones para calcular la composición de H₂, CO₂ y CH₄ en las muestras de biogás tomadas del RCTA.

$$C_{H_2} = \frac{A_{H_2} \left(\frac{C_{H_2STD}}{A_{H_2STD}} \right) * 100}{A_{H_2} \left(\frac{C_{H_2STD}}{A_{H_2STD}} \right) + A_{CO_2} \left(\frac{C_{CO_2STD}}{A_{CO_2STD}} \right) + A_{CH_4} \left(\frac{C_{CH_4STD}}{A_{CH_4STD}} \right)} [=]$$

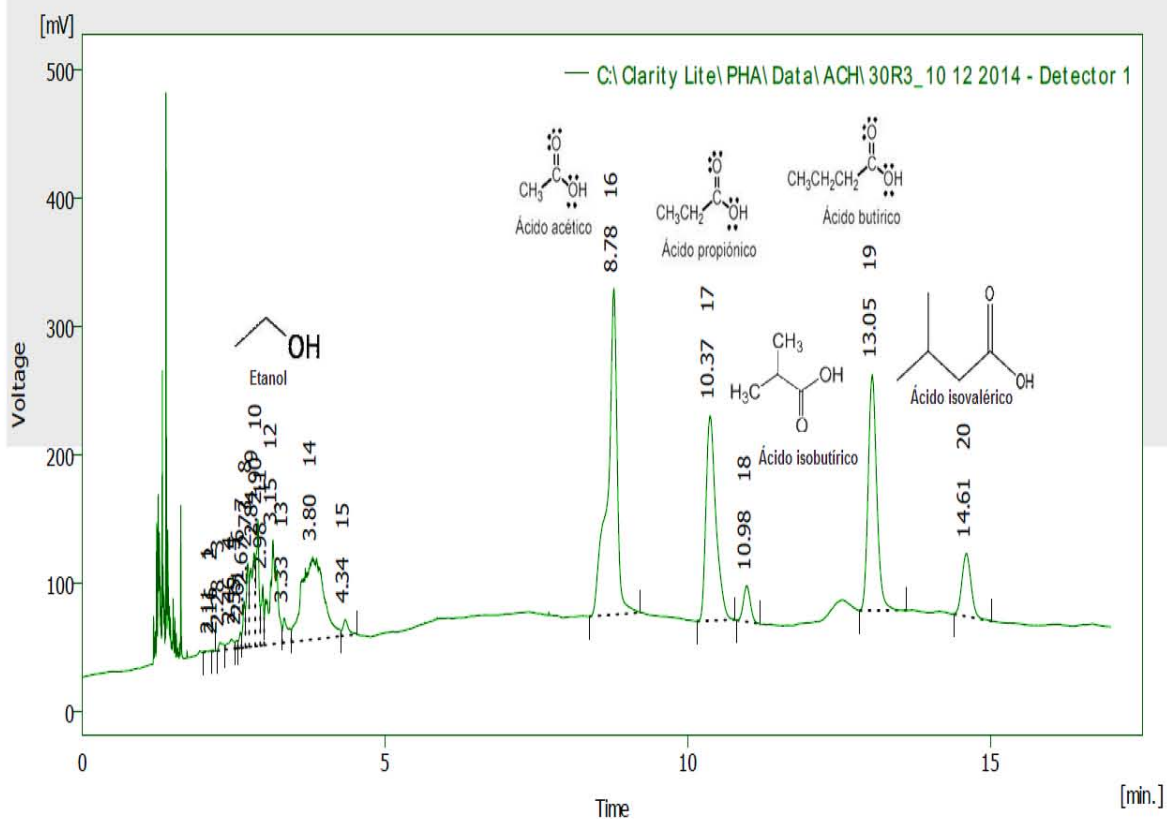
$$C_{CO_2} = \frac{A_{CO_2} \left(\frac{C_{CO_2STD}}{A_{CO_2STD}} \right) * 100}{A_{H_2} \left(\frac{C_{H_2STD}}{A_{H_2STD}} \right) + A_{CO_2} \left(\frac{C_{CO_2STD}}{A_{CO_2STD}} \right) + A_{CH_4} \left(\frac{C_{CH_4STD}}{A_{CH_4STD}} \right)} [=] \%v/v$$

$$C_{CH_4} = \frac{A_{CH_4} \left(\frac{C_{CH_4STD}}{A_{CH_4STD}} \right) * 100}{A_{H_2} \left(\frac{C_{H_2STD}}{A_{H_2STD}} \right) + A_{CO_2} \left(\frac{C_{CO_2STD}}{A_{CO_2STD}} \right) + A_{CH_4} \left(\frac{C_{CH_4STD}}{A_{CH_4STD}} \right)} [=] \%v/v$$

$$C_{H_2} + C_{CO_2} + C_{CH_4} = 100\%$$

Dónde: C_{H₂} es la concentración del H₂, C_{CO₂} es la concentración del CO₂, C_{CH₄} es la concentración del CH₄, A_{H₂} es el área del H₂, A_{CO₂} es el área del CO₂, A_{CH₄} es el área del CH₄, A_{H₂STD} es el área estándar del H₂, A_{H₂STD} es el área del estándar del H₂=2812, A_{CO₂STD} es el área del estándar de CO₂=146, A_{CH₄STD} es el área del estándar del CH₄=447, C_{H₂STD} es la concentración del estándar H₂=50%, C_{CO₂STD} es la concentración del estándar de CO₂=30% y C_{CH₄STD} es la concentración del estándar de CH₄=20%.

Anexo 3. Cromatograma de gases de una muestras de digestato tomada del RCTA.



Result Table (Uncal - C:\Clarity Lite\PHA\Data\ACH\30R3_11

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]
1	2.110	2.833	0.781	0.0
2	2.163	1.557	0.649	0.0
3	2.277	31.395	6.091	0.3
4	2.463	53.241	7.666	0.5
5	2.550	16.950	6.200	0.2
6	2.610	30.414	12.477	0.3
7	2.670	93.516	36.105	0.9
8	2.733	190.402	65.559	1.7
9	2.837	366.610	72.846	3.4
10	2.900	332.984	98.311	3.0
11	2.980	132.533	47.132	1.2
12	3.150	709.907	81.258	6.5
13	3.333	117.253	19.190	1.1
14	3.803	1613.993	64.351	14.8
15	4.343	80.091	12.698	0.7
16	8.780	2761.625	254.140	25.3
17	10.370	1836.231	159.894	16.8
18	10.980	225.104	28.098	2.1
19	13.050	1822.392	184.062	16.7
20	14.607	514.899	49.262	4.7
	Total	10933.932	1206.769	100.0

Productos derivados de la tesis

Artículos en revistas indexadas publicados

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*, En prensa. doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.04.046.

Artículos en extenso en congresos nacionales e internacionales

Mar-Álvarez. I., Castillo-Hernández A., Moreno-Andrade I., 2014. Effect of Persian lime on hydrogen production from food organic solid waste. XIV International Congress of the Mexican Hydrogen Society. 30/09-04/10/2014. Cancun, México.

Castillo-Hernández A., Mar-Álvarez. I., Moreno-Andrade I., 2014. Start-up of a continuous stirred-tank reactor for biohydrogen production from restaurant organic waste. XIV International Congress of the Mexican Hydrogen Society. 30/09-04/10/2014. Cancun, México.

Castillo Hernández A., Moreno Andrade I., 2015. Effect of organic loading rate on fermentative hydrogen production from food waste on a continuous stirred tank reactor. 4th IWA México Young Water Professionals Conference 2015. Guanajuato, Gto. 22-24/04/2015.

Castillo Hernández A., Moreno Andrade I., 2014. Producción de hidrógeno en un reactor continuo de tanque agitado a partir de residuos orgánicos de restaurantes. 2^{do} Encuentro de Jóvenes Investigadores en el Estado de Querétaro. 5-6/11/2014. Querétaro, Qro.

Díaz Parra G.A., A. Castillo Hernández, I. Mar Álvarez, Moreno Andrade I., 2014. Operación de un biorreactor para la producción de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos. 3er Encuentro de Jóvenes Investigadores en el Estado de Aguascalientes. 27-28/11/2014. Aguascalientes, Ags.