

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Producción de biohidrógeno a partir de residuos
agroindustriales generados en la Cuenca del Papaloapan en el
estado de Veracruz”**

TESIS

Que presenta

M. en C. PAULA NATALIA ROBLEDO NARVÁEZ

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de la tesis:

Dr. Héctor Mario Poggi-Varaldo

México, D.F.

Abril, 2014

Agradecimientos

Para el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante la beca No. 167133 y el financiamiento parcial del CINVESTAV.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó en los laboratorios 33 y 34 (Ambiental) del departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (Cinvestav) del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Héctor Mario Poggi-Varaldo.

Al M. en C. Rafael Hernández Vera, al Lic. David López Portilla y a la Ing. Teresa Sánchez por todo su apoyo y asistencia en el laboratorio 33.

Al Químico Cirino Rojas por su asesoría e importante ayuda en los análisis realizados en Central Analítica.

Comité tutorial



Dr. Graciano Calva-Calva
Investigador Titular 3A
DBB, Cinvestav-IPN
Biotatálisis y Biología Molecular



Dr. Carlos Estrada Vázquez
Profesor Investigador
UMAR
Bioremediación (Tratamiento biológico de aguas
residuales)
Manejo de residuos sólidos municipales



Dr. C. J. Juvencio Galíndez Mayer
Investigador Titular
ENCB-IPN
Biotecnología y bioingeniería



Dr. Luis Alfredo Ortega Clemente
Profesor Investigador titular C
ITBoca
Biotecnología acuícola



Dr. Héctor Mario Poggi-Varaldo
Investigador Titular 3C.
DBB, Cinvestav-IPN
Biotecnología Ambiental



Dra. Teresa Ponce-Noyola
Investigadora Titular 3C.
DBB, Cinvestav-IPN
Bioprocesos y Bioproductos



M. en C. Noemí Rinderknecht Seijas
Profesora
ESIQIE-IPN



Q.F.B. Elvira Ríos Leal
Investigadora CINVESTAV 1C
DBB, Cinvestav-IPN
Biotecnología Ambiental

Dedicatoria

A quienes me acompañaron en este camino sinuoso pero jocoso

A mi familia por ser y estar conmigo por convicción y no solo por imposición de la vida

A mis amigas, porque por fin entendí que es ser parte de un clan

A esos entes que la vida nos pone en el camino para no volarnos los recuerdos de golpe

...y en especial a esa criatura que irrumpió en mi vida, a ti Romina por ser mi mejor motivo, el único.

Proverbios 9:10-12.

INDICE

	Página
Índice	<i>i</i>
Índice de Tablas	<i>v</i>
Índice de Figuras	<i>viii</i>
Notación	<i>xi</i>
Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción y antecedentes	5
1.1. Energías convencionales fósiles	5
1.2. Fuentes de energías renovables	6
1.2.1. Hidrógeno a partir de residuos orgánicos como recurso energético renovable	7
1.2.1.1. Producción de biohidrógeno (BioH ₂)	8
1.2.1.2. Fermentación oscura	12
1.2.1.2.1. Inhibición de metanogénesis por tratamiento térmico	13
1.2.1.2.2. Inhibición de metanogénesis por inhibidores químicos	20
1.2.1.2.3. Efecto de ósmosis y pH sobre los microorganismos	20
1.2.1.2.3.1. Efecto de la osmosis sobre el metabolismo microbiano	21
1.2.1.2.3.2. Efecto del pH sobre el metabolismo microbiano	25
1.2.1.2.3.3. Efecto de presión osmótica y pH en la producción fermentativa de hidrógeno	27
1.2.1.3. Fermentación fotoheterótrofa	31
1.2.1.3.1. Bacterias púrpura no del azufre (BPNA)	32
1.2.1.3.2. Uso de fotobiorreactores en la producción de hidrógeno	41
1.3. Región de la Cuenca del Papaloapan del Estado de Veracruz	45
1.3.1. Producción agroindustriales en la región de la Cuenca del Papaloapan	45
1.3.1.1. Producción de azúcar	46
1.3.1.2. Producción de piña	48
1.3.1.3. Producción de arroz	49
2. Justificación	55
3. Hipótesis	56
3.1. Hipótesis general	56
3.2. Hipótesis particulares	56
4. Objetivos	57
4.1. Objetivo general	57
4.2. Objetivos específicos	57

5. Alcance	58
6. Metodología	59
6.1. Estrategia de trabajo	59
6.2. Diseño experimental y métodos	61
6.2.1. Actividad 1. Procuración y caracterización de los residuos agroindustriales.	61
6.2.1.1. Propósito de la actividad 1	61
6.2.1.2. Programa de seguimiento y análisis de la actividad 1	61
6.2.1.3. Métodos y procedimientos	62
6.2.1.3.1. Actividad de agua (a_w)	63
6.2.1.3.2. Capacidad de retención de agua (CRA)	64
6.2.1.3.3. Conductividad eléctrica	64
6.2.2. Actividad 2. Arranque y operación de digestores anaerobios de sustrato sólido metanogénico (DASSM)	66
6.2.2.1. Propósito de la actividad 2	66
6.2.2.2. Diseño experimental de la actividad 2	66
6.2.2.3. Programa de seguimiento y análisis de la actividad 2	68
6.2.2.4. Métodos y procedimientos de la actividad 2	69
6.2.3. Actividad 3. Manejo de digestores anaerobios de sustrato sólido acidogénico (DASSA) mesofílico y termofílico	71
6.2.3.1. Propósito de la actividad 3	71
6.2.3.2. Diseño experimental de la actividad 3	71
6.2.3.3. Actividad 3a. Manejo de digestores anaerobios de sustrato sólido acidogénico (DASSA) mesofílico	74
6.2.3.3.1. Programa de seguimiento y análisis de la actividad 3a y b	74
6.2.3.3.2. Métodos y procedimientos de la actividad 3a y b	74
6.2.3.4. Actividad 3b. Manejo de digestores anaerobios de sustrato sólido acidogénico (DASS-A) termofílico	76
6.2.3.5. Actividad 3c. Manejo de minirreactores en fermentación anaerobia de sustrato sólido hidrogenogénica con venteo intermitente (FASSH-VI)	76
6.2.3.5.1. Propósito de la actividad 3c	76
6.2.3.5.2. Diseño experimental de la actividad 3	76
6.2.3.5.3. Programa de seguimiento y análisis de la actividad 3c	78
6.2.3.5.4. Métodos y procedimientos de la actividad 3c	79
6.2.3.5.4.1. Procedimiento de inoculación de los FASSH-VI	79
6.2.3.5.4.2. Procedimiento del venteo y gaseo con N_2 de la FASSH-VI	80
6.2.3.5.4.3. Procedimiento de obtención del extracto de la FORSA y la FORSA acondicionada usada en la FASSH-VI	81

6.2.4. Actividad 4. Balance energético de DASSA-mesofílico y DASSA-termofílico	82
6.2.4.1. Propósito de la actividad 4	82
6.2.4.2. Métodos y procedimientos de la actividad 4	82
6.2.5. Actividad 5. Desarrollo y preservación de cultivos fotoheterótrofos hidrogenogénicos	85
6.2.5.1. Propósito de la actividad 5	85
6.2.5.2. Programa de seguimiento y análisis de la actividad 5	85
6.2.5.3. Métodos y procedimientos	86
6.2.6. Actividad 6. Operación de los fotobiorreactores en sistemas en lote	88
6.2.6.1. Propósito de la actividad 6	88
6.2.6.2. Diseño experimental de la actividad 6	88
6.2.6.3. Programa de seguimiento y análisis de la actividad 6	90
6.2.6.4. Métodos y procedimientos para la actividad 6	91
7. Resultados y discusión	93
7.1. Resultados y discusión de la actividad 1. Procuración y caracterización de los residuos agroindustriales	93
7.2. Resultados de la actividad 2. Arranque y operación de digestores anaerobios de sustrato sólido metanogénico	102
7.3a. Resultados de la actividad 3a. Manejo de digestores anaerobios de sustrato sólido acidogénico mesofílico (DASSA-M)	115
7.3b. Resultados de la actividad 3b. Manejo de digestores anaerobios de sustrato sólido acidogénico termofílico (DASSA-T)	122
7.3c. Resultados de la actividad 3c. Operación de minirreactores en fermentación anaerobia hidrogenogénica en sustrato sólido con venteo intermitente (FASSH-VI)	124
7.4. Resultados de la actividad 4. Realizar balance energético de DASSA-M y DASSA-T	141
7.5. Resultados de la actividad 5. Desarrollo y preservación de cultivos fotoheterótrofos hidrogenogénicos	145
7.6. Resultados de la actividad 6. Operación de fotobiorreactores en sistema en lote	148
7.7. Resultados de la actividad extra. Caracterización de poblaciones microbianas en los reactores DASSA (esta actividad no está dentro de la estrategia de trabajo)	156
8. Conclusiones	160
9. Referencias	163

Anexo A. Producción del trabajo de tesis	169
A1. Artículos en revista indexadas Thomson-Reuters	169
A2. Capítulos en libros	169
A3. Artículos completos en congresos	170
A4. Resúmenes en congresos	171
Anexo B. Producción de biogás y metano en los DASSM-T	173
Anexo C. Comportamiento dinámico de los DASSA-M	177
Anexo D. Comportamiento dinámico de la FASSH-VI (actividad 3c)	181
Anexo E. Técnicas Analíticas	188
E1. Nitrógeno Total Kjeldahl	188
E2. Fósforo Total	190
E3. Azúcares Reductores, Método del ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS)	194
E4. Determinación de sólidos	196
E5. Determinación de capacidad de retención de agua	197
Anexo F. Memorias de cálculos	199
F1. Cálculo de producción de hidrógeno extra por FF	199
F2. Cálculo de balance energético de DASSA-M y DASSA-T	201
F3. Cálculo de balance energético de DASSA-M y DASSA-T con datos de Valdez-Vazquez et al., 2006	203
F4. Cálculo de balance energético de DASSA-M y DASSA-T con datos propios	206
F5. Eficiencia de conversión de sustrato	207
F6. La eficiencia de conversión de luz	208
F7. Moles teóricos de hidrógeno producido en fotofermentación (Koku et al., 2002)	210
F8. Balance de energía para FASSH-VI	211
F9. Balance de energía para DASSA-M	218

INDICE DE TABLAS

TABLA	Página
Tabla 1. Resumen de procesos biológicos de producción de hidrógeno (adaptado de Reith <i>et al.</i> 2003)	10
Tabla 2. Estudios representativos de producción de hidrógeno en fermentación oscura	14
Tabla 3. Valores extremos de los factores ambientales más evidentes bajo los cuales se ha observado vida activa microbiana (adaptado de Scheie, 1970)	23
Tabla 4. pH mínimo, óptimo y máximo para el crecimiento de bacteria de suelo (Adaptado de Carpenter, 1977)	27
Tabla 5. Estudios representativos de producción de hidrógeno en fotofermentación	37
Tabla 6. Producción de azúcar en el estado de Veracruz en el 2006	46
Tabla 7. Producción de piña cayena lisa en México	49
Tabla 8. Producción de piña cayena lisa en Veracruz	49
Tabla 9. Producción nacional de arroz en el 2000 y 2006	50
Tabla 10. Producción de arroz en el estado de Veracruz en el 2000 y 2006	50
Tabla 11. Caracterización de residuos agroindustriales	62
Tabla 12. Método para cada determinación a realizar de los residuos agroindustriales	63
Tabla 13. Variables de respuesta de la actividad 2	67
Tabla 14. Parámetros de seguimiento y análisis de los digestores anaerobios de sustrato sólido metanogénico	70
Tabla 15. Intervalo de cargas utilizadas en trabajos internacionales con fermentación sumergida de residuos	71
Tabla 16. Diseño factorial de la actividad 3	72
Tabla 17. Variables de respuesta de la actividad 3	73
Tabla 18. Parámetros de seguimiento y análisis de la actividad 3a y b	75
Tabla 19. Diseño de puntos centrales para las variables de contenido inicial de	77

sólidos totales y pH inicial, cantidad FA y inóculo en cada UE y composición de la FA	
Tabla 20. Variables de respuesta del diseño experimental de puntos centrales	78
Tabla 21. Parámetros de seguimiento y análisis de la actividad 3c	78
Tabla 22. Soluciones amortiguadoras de fosfatos a diferentes pH	79
Tabla 23. Programa de seguimiento y análisis de la actividad 6	92
Tabla 24. Caracterización de residuos agroindustriales	95
Tabla 25. Comparación de resultados de lignina con valor reportado en literatura	96
Tabla 26. Comparación de resultados de celulosa con valor reportado en literatura	96
Tabla 27. Comparación de resultados de NKT con valor reportado en literatura	96
Tabla 28. Comparación de resultados de proteína con valor reportado en literatura	97
Tabla 29. Caracterización de la FORSA	97
Tabla 30. Concentración y conductividad eléctrica esperada de la solución de KCl (Castellan, 1988)	100
Tabla 31. Conductividad eléctrica del extracto de la FORSA y la FORSA acondicionada a diferentes cantidades de sólidos totales en la alimentación	100
Tabla 32. Seguimiento de la producción acumulada de biogás en los DASSM-M	104
Tabla 33. Parámetros medidos en los DASSM-M	105
Tabla 34. Seguimiento de la producción acumulada de biogás en los DASSM-T	112
Tabla 35. Parámetros medidos en los DASSM-T	113
Tabla 36. Parámetros medidos en los DASSA-M	116
Tabla 37. Parámetros medidos en los DASSA-T	123
Tabla 38. Producción acumulada en cada ciclo de producción de hidrógeno	125
Tabla 39. Efecto principal de ST sobre $P_{H_2,cum}$ (mmol/reactor)	127
Tabla 40. Efecto principal de pH sobre $P_{H_2,cum}$ (mmol/reactor)	127
Tabla 41. Capacidades caloríficas de componentes de la FORSU (Badui, 2006)	142
Tabla 42. Propiedades térmicas de los elementos involucrados en el balance térmico	143
Tabla 43. Consideraciones de diseño y escalamiento, Poggi-Varaldo (2008) comunicación personal (Perry, 1992)	144

Tabla 44. Balance de energía para FASSHVI y DASSA-M	144
Tabla 45. Concentración de metabolitos presentes en los sólidos gastados de DASSA-M y en extracto	149
Tabla 46. Materia orgánica alimentada a fotofermentaciones	150
Tabla 47. Parámetros medidos en la fotofermentación	151
Tabla 48. Producción de hidrógeno en dos etapas	155

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	Página
Figura 1. Ruta representativa de la evolución fermentativa de hidrógeno y algunos otros sub-productos (adaptado de <i>Ren et al.</i> , 1997).	11
Figura 2. Vías de producción de hidrógeno.	12
Figura 3. Géneros principales de las BPNS.	33
Figura 4. Estructura de todas las bacterioclorofilas conocidas de las BPNS (tomado de Bitton, 2002).	34
Figura 5. Sistema global de producción de hidrogeno en las BPNS.	35
Figura 6. Sistemas de una y dos etapas para la producción de hidrógeno usando <i>Rhodobacter sphaeroides</i> RV.	42
Figura 7. Fotobiorreactores de cara plana empleados por: (a) Takabatake <i>et al.</i> (2004), (b) Zabut <i>et al.</i> (2006).	43
Figura 8. (a) Esquema de fotobiorreactor empleado por Lata <i>et al.</i> (2007); (b) Esquema de fotobiorreactor equipado con fuente luz interna (fibra óptica) y externa (lámpara de halógeno y tungsteno) empleado por Chen <i>et al.</i> (2006).	44
Figura 9. Estado de Veracruz, región de la Cuenca del Papaloapan.	47
Figura 10. Estrategia de trabajo.	60
Figura 11. Diseño experimental de la actividad 2.	68
Figura 12. Procedimiento de inoculación de los FASSH-VI.	80
Figura 13. Procedimiento de venteo y gaseo de los FASSH-VI.	81
Figura 14. Producción de hidrógeno usando digestores anaerobios de sustrato sólido acidogénico.	83
Figura 15. Ilustración de la estratificación en una columna Winogradsky.	87
Figura 16. Esquema del fotobiorreactor.	92
Figura 17. Residuos agroindustriales: (a) bagazo de caña y residuos de piña tal como se recolectan, (b) bagazo de caña y residuos de piña como se almacenan.	94
Figura 18. Actividad de agua de la alimentación (FORSA) a diferentes contenidos de sólidos totales.	99
Figura 19. Potencial de agua de la alimentación (FORSA) a diferentes contenidos de sólidos totales.	99
Figura 20. Producción acumulada de biogás y % de metano en: (a) DASSM-1 y (b) DASSM-2, (B=Pulso de bicarbonato de sodio, F=alimentación con FORSA, F-B: alimentación con FORSA + 0.5g de bicarbonato de Sodio).	107
Figura 21. Producción acumulada de biogás y % de metano en: a) DASSM-3 y b)	108

DASSM-4	
(B=Pulso de bicarbonato de sodio, F=alimentación con FORSA, F-B: alimentación con FORSA + 0.5g de bicarbonato de Sodio).	
Figura 22. Producción acumulada de biogás y % de metano en: a) DASSM-5 y b) DASSM-6	109
(B=Pulso de bicarbonato de sodio, F=alimentación con FORSA, F-B: alimentación con FORSA + 0.5g de bicarbonato de Sodio).	
Figura 23. Producción acumulada de biogás y % de metano en: a) DASSM-7 y b) DASSM-8	110
(B=Pulso de bicarbonato de sodio, F=alimentación con FORSA, F-B: alimentación con FORSA + 0.5g de bicarbonato de Sodio).	
Figura 24. Efecto del TRM sobre la producción de biogás:a) durante todos los días de operación; b) en los días de mejor desempeño.	118
Figura 25. Efecto del TRM sobre la producción de H ₂ (%):a) durante todos los días de operación; b) en los días de mejor desempeño.	119
Figura 26. Efecto del TRM sobre la producción de H ₂ :a) durante todos los días de operación; b) en los días de mejor desempeño.	120
Figura 27. Efecto de TRM sobre la productividad de H ₂ :a) durante todos los días de operación; b) en los días de mejor desempeño.	121
Figura 28. (a) Superficie de respuesta de producción acumulada de hidrógeno; (b) Efecto de los sólidos totales; (c) pH inicial sobre la producción acumulada de H ₂ .	126
Figura 29. (a) Superficie de respuesta de la concentración de ácidos orgánicos volátiles; (b) Superficie de respuesta de la concentración de solventes generados; (c) superficie de respuesta de la relación de AOV/Solv; (las ecuaciones están en términos de las variables codificadas).	131
Figura 30. (a) superficie de respuesta del pH final; (b) superficie de respuesta de ΔpH (las ecuaciones están en términos de las variables codificadas).	133
Figura 31. (a) Superficie de respuesta de producción acumulada de metano; (b) superficie de respuesta de la relación de A/B (las ecuaciones están en términos de las variables codificadas).	135
Figura 32. Relación de la producción de hidrógeno con la actividad de agua y el potencial de agua en función de los sólidos totales en la alimentación.	136
Figura 33. Relación de la producción de hidrógeno y la conductividad eléctrica en función de los sólidos totales en la alimentación.	137
Figura 34. Presencia de BPNS en la columna Winogradsky.	145
Figura 35. Botellas serológicas inoculadas con BPNS.	146

Figura 36. Procedimiento típico de mantenimiento de cultivo de BPNS, a) 1er pase; b) 2do pase (A, G: alimentación y gaseo con argón).	147
Figura 37. Producción de hidrógeno en fotofermentación en lote para (a) <i>Rhodospseudomonas palustris</i> , (b) G3 (las flechas indican el momento de gaseo).	154
Figura 38. Gel de agarosa de los DASSM 1-4 (D1: DASSM-1, D2: DASSM-2, D3: DASSM-3, D4: DASSM-4).	157
Figura 39. Gel de agarosa de los amplificadores del DNA de los DASSM 1-4 (D1: DASSM-1, D2: DASSM-2, D3: DASSM-3, D4: DASSM-4, MPM: marcador de peso molecular).	157
Figura 40. Geles de poliacrilamida de los DASSM 1-4, con un gradiente de temperatura de 39-52°C, 118V, 7mA durante 2 h, a) amplificado 1 de la extracción 1, b) amplificado 2 de la extracción 1, c) amplificado 1 de la extracción 2.	158
Figura 41. Gel de agarosa del DASSM-6 y DASSM-8.	159

NOTACIÓN

A/B	Relación de producción de ácido acético y producción de ácido butírico
AFBR	Reactor anaerobio de lecho fluidizado
AOV	Ácidos orgánicos volátiles
ASBR	Anaerobic sequencing batch reactor
ATP	Adenosin-trifosfato
a_w	Actividad de agua
B_v	Carga orgánica volumétrica
BPNS	Bacteria Purpura no sulfurosa
BuOH	Butanol
C_i	Concentración inicial
C_p	Capacidad calorífica
C/N	Relación carbono-nitrógeno
CRA	Capacidad de retención de agua
CSTR	Reactor continuo de tanque agitado
DASS	Digestor anaerobio de sustrato sólido
DASSA	Digestor anaerobio de sustrato sólido acidogénico
DASSA-M	Digestor anaerobio de sustrato sólido acidogénico mesofílico
DASSA-T	Digestor anaerobio de sustrato sólido acidogénico termofílico
DASSM	Digestor anaerobio de sustrato sólido metanogénico
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis (Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante)
DQO	Demanda química de oxígeno
EtOH	Etanol
FA	FORSA acondicionada
FASSH-VI	Fermentación anaerobia de sustrato sólido hidrogenogénico con venteo intermitente
FF	Fermentación fotoheterótrofa
FFH	Fermentación fotoheterótrofa hidrogenogénica
FHH	Fotoheterótrofo hidrogenogénico
FID	Detector de ionización de flama
FISH	Fluorescente in situ hybridization
FL	Fermentación libre
FO	Fermentación oscura
FORSA	Fracción orgánica de residuos sólidos agrícolas
FORSM	Fracción orgánica de residuos sólidos municipales
FORSU	Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos
FSS	Fermentación de sustrato sólido
g_{bh}	Graos en base húmeda
g_{ps}	Gramos en peso seco
H	Hidrogenogénico
HAc	Ácido acético
HBu	Ácido butírico
HLac	Ácido láctico
HPr	Ácido propiónico

IRPR	Reactor de lecho empacado con recirculación interna
M	Metanogénico
msh	Masa de sustrato húmedo
msh	Masa de sustrato seco
MeOH	Metanol
NA	No aplica
ND	No detectado
NKT	Nitrógeno Kjeldahl total
NL	Volumen en litros, normalizados a 273 K y 101.325 KPa
NmL	Volumen en mililitros, normalizados a 273 K y 101.325 KPa
P_{H_2}	Producción de hidrógeno
$P_{H_2,cum}$	Producción acumulada de hidrógeno
P_{CH_4}	Producción de metano
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PDBR	Biofilm configured periodic discontinuous batch reactor
PEM	Proton exchange membrane
Q	Carga hidráulica
Q_{bg}	Producción de biogás
Q_{CH_4}	Producción de metano
Q_{H_2}	Producción de hidrógeno
RLE	Reactor de lecho empacado
RM	Régimen mesofílico
RSOA	Residuos sólidos orgánicos artificiales
RSOP	Residuos sólidos orgánicos pulverizados
RT	Régimen termofílico
S_o	concentración de sólidos volátiles en la alimentación
Solv	Solventes
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
ST	Sólidos totales
SV	Sólidos volátiles
TCA	Ácidos tricarboxílicos
TIJ	Torta industrial de jugo
TO	Tiempo de operación
TOt	Tiempo de operación total
TRH	Tiempo de retención hidráulico
TRM	Tiempo de retención másico
UASB	Upflow anaerobic sludge bed reactor
UE	Unidad experimental
VFA	Ácidos grasos volátiles
VO	Volumen de operación
V_r	Volumen del reactor
Y'_{H_2}	Pseudorendimiento de productividad de hidrógeno

Caracteres griegos

α	Cociente entre alcalinidad intermedia y alcalinidad parcial
$\eta_{ac.org.}$	Eficiencia de conversión hidrógeno-sustrato
$\eta_{H2/luz}$	Eficiencia luminosa
$\eta_{H2/sustrato}$	Eficiencia de conversión hidrógeno-sustrato
η_{DQO}	Eficiencia de remoción de DQO
η_{sv}	Eficiencia de remoción de sólidos volátiles
γ	Alcalinidad
θ	Tiempo de retención hidráulico
ρ	Relación entre la producción de ácidos orgánicos y solventes

Resumen.

Este trabajo tuvo como objetivo desarrollar y evaluar un proceso biológico con dos etapas en serie para maximizar la producción de biohidrógeno a partir de residuos agroindustriales como el bagazo de caña y de piña, provenientes de la cuenca del Papaloapan.

Los objetivos específicos fueron: (i) caracterizar los residuos agroindustriales para así establecer una mezcla balanceada de desechos que se alimentará al proceso biológico, (ii) evaluar correlaciones de la actividad de agua (a_w), capacidad de retención de agua (CRA) y conductividad eléctrica a diferentes contenido de sólidos totales (ST) de la alimentación en la producción de biohidrógeno, (iii) evaluar el efecto del régimen mesofílico y termofílico, además del tiempo de retención másico (TRM) sobre la producción de biohidrógeno en proceso de digestión anaerobia de sustrato sólido acidogénico (DASSA), (iv) realizar balances energéticos de DASSA-mesofílico y DASSA-termofílico, para concluir si algún eventual efecto benéfico DASSA-termofílico sobre la producción de biohidrógeno compensa los consumos adiciones de energía de la termofilia, (v) Evaluar el efecto del contenido de ST y pH en la alimentación sobre la producción de biohidrógeno en fermentación anaerobia de sustrato sólido acidogénica con venteo intermitente (FASSH-VI), (vi) caracterizar los extractos de sólidos gastados generados durante la digestión de la fracción orgánica de residuos sólidos agroindustriales (FORSA), (vii) desarrollar cultivos fotoheterótrofos hidrógenogénicos (FHH) a partir de inóculos naturales e implantar protocolos de preservación de los mismos, (viii) evaluar la producción adicional de biohidrógeno a partir de extractos de sólidos gastados de la fermentación oscura (FO) con cultivos FHH en condiciones en lote evaluando el efecto de pH ácido sobre la inhibición de metano.

Se desarrolló y evaluó un proceso biológico con etapas en serie, el proceso se basó en fermentación normal en sustrato sólido en lote seguido de extracción y fotofermentación hidrógenogénica de los extractos. La primera etapa del proceso

en serie usó la FORSA como sustrato porque tiene potencial hidrógenogénico dado su perfil de contenidos moderado a alto de celulosa y hemicelulosa.

La fermentación hidrógenogénica semicontinua de FORSA dio resultados muy pobres donde mesofilia y tiempo de retención másica de 13 d fueron las condiciones en que produjo más bioH₂ con DASSA.

Se vió que el contenido de sólidos totales de la alimentación afecta profundamente la actividad de agua (a_w) y potencial mátrico del sustrato. Muy probablemente la baja actividad de agua de FORSA a 35% ST utilizado en DASSA pudiera explicar el pobre desempeño de ese proceso. Esta hipótesis se exploró con los experimentos de FASSH-VI, donde se evaluó el efecto del contenido de ST y pH inicial en la alimentación sobre la producción de biohidrógeno en FASSH-VI. Los resultados indican que conforme aumenta la cantidad de sólidos totales se tienen un efecto negativo en la producción de hidrógeno. Se confirma que el intervalo de pH que favorece la producción de hidrógeno es 6.0-6.5.

Los extractos de sólidos gastados generados durante la fermentación hidrógenogénica de la FORSA, resultaron ricos en ácidos orgánicos y en menor concentración de solventes. Por tanto, fueron un sustrato factible para una segunda etapa fotoheterótrofa productora de hidrógeno.

El método de presión selectiva basado sobre la operación de columnas de Winogradsky condujo a consorcios con atractiva capacidad de producción de hidrógeno, el consorcio G3 enriquecido en bacterias púrpuras no sulfurosas (BPNS), tuvo un desempeño similar a la cepa pura *Rodhopseudomonas palustris*, en la producción en lote de H₂ utilizando extractos diluidos 1:10 de la fermentación hidrógenogénica en sustrato sólido.

La etapa FFH significó una producción adicional de H₂ promedio del 65 y 61%, sobre la base de mmolH₂/Kg_{ss} para *Rodhopseudomonas palustris* y G3 respectivamente. Incidentalmente, en el tiempo operado en la fotofermentación no se presentó metano aún cuando el extracto de los sólidos gastados no fue esterilizado.

Abstract

This study aimed at developing and evaluating a biological process with two sequential stages to maximize biohydrogen production from agroindustrial residues such as sugarcane and pineapple bagasse from the Papaloapan catchment area.

The specific objectives were as follows: (i) to characterize the agroindustrial residues to establish a balanced mixture of waste to be fed to the biological process, (ii) to assess correlations of water activity (a_w), water holding capacity (WHC) and electrical conductivity at different total solids (TS) of substrate feed in biohydrogen production, (iii) to evaluate the effect of mesophilic and thermophilic regime in addition to the mass retention time (MRT) on biohydrogen production by acidogenic solid substrate anaerobic digestion (A-SSAD), (iv) to perform balances of energy of mesophilic A-SSAD and thermophilic A-SSAD to conclude whether any possible beneficial effect on thermophilic A-SSAD biohydrogen production compensates the consumption of energy addition of thermophilia, (v) to evaluate the effect of TS and pH content of the feed on biohydrogen production by solid substrate anaerobic hydrogenogenic fermentation with intermittent venting (SSAHF-IV), (vi) to characterize the extracts of spent solids generated during digestion of the organic fraction of agroindustrial solid waste (OFASW), (vii) to develop photoheterotrophic cultures from natural inocula and to implement preservation protocols thereof, (viii) to evaluate the additional production of biohydrogen from extracts of spent solids of the dark fermentation (DF) with photoheterotroph cultures on batch conditions by evaluating the effect of acid pH on the methane inhibition.

A biological process was developed and evaluated with stages in series. The process was based on normal solid substrate batch fermentation followed by extraction and hydrogenogenic photofermentation of the extracts. The first stage of the serial process used the OFASW as substrate because it has potential due to its content profile from moderate to high content of cellulose and hemicellulose.

The OFASW hydrogenogenic semicontinuous fermentation gave very poor results where mesophilic and mass retention time of 13 d were the conditions that produced more biohydrogen with A-SSAD.

The total solids content of substrate profoundly affects water activity (a_w) and matrix potential of the substrate. The low water activity of OFASW at 35% TS used in A-SSAD may likely explain the poor performance of that process. This hypothesis was explored with the SSAHF-IV experiments where the effect of the initial content of TS and initial pH on the feed on biohydrogen production in SSAHF-IV was evaluated. The results indicate that, as the quantity of total solids increase, there is a negative effect on hydrogen production. This confirms that the pH interval that favors hydrogen production is 6.0–6.5.

Extracts of spent solids generated during hydrogenogenic fermentation of OFASW were enriched in organic acids and in a lower concentration of solvents. Therefore, they were a feasible substratum for a second photoheterotrophic hydrogen production stage.

The selective pressure method based on the operation of Winogradsky columns led a consortium with an attractive capacity of hydrogen production. The G3 consortium enriched in purple non sulfur bacteria had a similar performance to the pure strain *Rodhospseudomonas palustris* in batch production of H_2 using diluted extract (1:10) of solid substrate hydrogenogenic fermentation.

The hydrogenogenic photofermentation step meant an additional average production of H_2 of 65 and 61% over that based on $mmolH_2/Kg_{ss}$ for *Rodhospseudomonas palustris* and G3, respectively. Incidentally, during the operated time of photofermentation, methane was not present even when the spent solid extract was not sterilized.

1. Introducción y Antecedentes

En la década de los 70's se produjeron eventos importantes a nivel mundial en el mercado del petróleo, que provocaron un encarecimiento notable de esta fuente de energía no renovable, surgiendo las preocupaciones sobre el suministro y precio futuro de la energía. Resultado de esto se han buscado opciones para reducir la dependencia de fuentes no renovables de energía; entre las opciones se reconsideró el mejor aprovechamiento de la energía solar y sus diversas manifestaciones secundarias tales como la energía eólica, hidráulica y las diversas formas de biomasa; es decir, las llamadas energías renovables (Comisión Nacional para el Ahorro de Energía, CONAE, www.conae.gob.mx).

Las fuentes de energías son aquellas que producen energía útil directamente o por medio de una transformación. Éstas se clasifican en dos tipos: primarias y secundarias.

La energía primaria corresponde a las distintas fuentes de energía tal y como se obtienen de la naturaleza; ya sea en forma directa o después de un proceso de extracción además de que se utiliza como insumo para obtener productos secundarios, se consideran diez fuentes primarias de energía: carbón mineral, petróleo crudo, condensados, gas natural, nucleenergía, hidroenergía, geoenergía, energía eólica, bagazo de caña y leña. Como energía secundaria se agrupan a los derivados de las fuentes primarias, los cuales se obtienen en los centros de transformación, con características específicas para su consumo final. Estos derivados son el coque de carbón, el coque de petróleo, el gas licuado de petróleo, las gasolinas y naftas, los querosenos, el diesel, el combustóleo, los productos no energéticos, el gas seco y la electricidad (Balance Nacional de Energía, 2006. SENER).

1.1. Energías convencionales fósiles

Del buen uso y de la estabilidad del recurso energético depende en gran medida la calidad de vida humana. Los hidrocarburos son una fuente de energía primaria que se pensó tenía grandes ventajas en cuanto a su extracción, manejo y uso, por lo que se convirtieron en el energético más importante desde el siglo XX, en el

siglo XIX los energéticos más importantes eran la madera y el carbón, a principios de los años setenta se plantearon serias dudas sobre la disponibilidad de los combustibles fósiles a nivel mundial.

A pesar de cierta controversia, se ha establecido que en las próximas décadas las reservas mundiales de petróleo disminuirán de forma acelerada, lo que traerá como consecuencia un fuerte impacto en la economía de aquellos países que no hayan desarrollado tecnologías alternativas de generación de energía.

México cuenta con grandes reservas probadas de hidrocarburos, alrededor de 40,000 millones de barriles de petróleo crudo equivalente. Sin embargo, la diversificación energética es necesaria por varios motivos principales: hay aspectos técnicos y económicos que limitan el volumen de hidrocarburos que se puede extraer del subsuelo y hay un aumento en el costo del barril a medida que se hace más compleja la extracción, y la gran desventaja es que finalmente, es un recurso no renovable (Putnam, 1953).

1.2. Fuentes de energías renovables

Los recursos energéticos renovables comprenden aquellos que son regenerados continuamente a causa de la presencia de fuerzas físicas como marea, viento, agua en caída, gradientes térmicos en el océano, calor geotérmico, aportación solar o la generación de material vegetal o animal; mientras que, los recursos energéticos no renovables se refieren a los combustibles fósiles o a minerales radioactivos. Los combustibles fósiles como petróleo, gas natural y carbón son considerados no renovables debido a que su tasa de renovación es menor a la tasa de explotación.

Como parte de este escenario, algunos medios científicos han propuesto un cambio radical en el vector energético mundial y el paso de una economía basada en el petróleo a una basada en el hidrógeno como combustible. Obviamente, este paso requeriría de un periodo de transición que permitiera sustituir la tecnología que ha soportado el desarrollo mundial desde la Revolución Industrial hasta nuestros días, por una nueva tecnología no contaminante y de mayor eficiencia de

conversión, sin embargo esta propuesta seguiría empleando la plataforma energética existente (Poggi-Varaldo, 2013).

Las fuentes de energía renovable han sido de gran interés para las comunidades internacionales en las últimas décadas, la biomasa es una de las fuentes antiguas y promisorias como fuente de energía en la que se incluye desechos orgánicos, de animales, aguas residuales, residuos agrícolas e industriales (Antonopoulou *et al.*, 2008, Escamilla-Alvarado *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2013). Hoy en día la biomasa suministra aproximadamente el 14% del total de las necesidades energéticas a nivel mundial (International Energy Agency, 1998), Zhang *et al.* (2007) mencionan que tan solo los residuos agroindustriales exceden los 220 mil millones de ton/año a nivel mundial, equivalente a la energía obtenida de 60-80 mil millones de toneladas de petróleo crudo.

Existen varias tecnologías de conversión de energía para la explotación de la biomasa, una es la combustión directa (representa aproximadamente el 97% de la producción de bioenergía), gasificación, pirolisis y el tratamiento biológico (Demirbas, 2004). Éste último ha tenido un avance económico y ambiental comparado con otras tecnologías. La biomasa puede ser convertida biológicamente a combustible líquido o gaseoso, como el metanol, etanol, metano e hidrógeno, los cuales han sido denominados como los combustibles del futuro (Claassen *et al.*, 1999). Por ejemplo, mediante la aplicación de procesos de estabilización anaerobia de efluentes residuales y con el apoyo de modernas técnicas de control es posible optimizar el contenido de biometano en los gases generados por efluentes urbanos e industriales. Igualmente, procesos de este tipo pueden emplearse para producción de biohidrógeno.

1.2.1. Hidrógeno a partir de residuos orgánicos como recurso energético renovable

El hidrógeno es un combustible limpio y ambientalmente amigable, puede ser producido de manera renovable a partir de residuos orgánicos entre otros, se considera el más auspicioso reemplazante de los combustible fósiles, esto considerando su alta capacidad energética (122 KJ/g; Chang y Lin, 2004; Kim *et*

al., 2006; Aceves-Lara *et al.*, 2008; Mizuno *et al.*, 2002; Das, 2009) respecto al metano (36.3 KJ/g; Park *et al.*, 2005) y que su combustión sólo genera agua. El hidrógeno se obtiene por reformación catalítica de biomasa y electrólisis de agua y también es posible su obtención a través de procesos biológicos (Levin *et al.*, 2004), uno de esos procesos biológicos es el proceso anaeróbico de digestión de sustratos orgánicos, lo que además, contribuye al tratamiento de residuos de alto contenido orgánico, principalmente carbohidratos (Van Ginkel *et al.*, 2005).

El hidrógeno ha sido identificado como un combustible ideal para la transportación, por su potencial de conversión en celdas de combustión a energía eléctrica y a su vez en energía mecánica sin producción de CO₂. Esto da la idea de un manejo económico del hidrógeno. La producción biológica de hidrógeno a partir de biomasa podría ofrecer energía a bajo costo y ser una alternativa no contaminante.

Ante un mundo donde los altos precios del petróleo crudo, la disminución de las fuentes del mismo, la inestabilidad de los países productores y los cambios climáticos, aunado a la necesidad de un uso eficiente e inteligente de la energía, la biomasa tiene el potencial de suplir la necesidad energética de la civilización.

1.2.1.1. Producción de biohidrógeno

Las plantas son una fuente de biomasa abundante y renovable de energía ya que son ricos en carbohidratos que pueden ser convertidos eficientemente por microorganismos a biocombustibles tales como el bioetanol, biometano, biobutano, biometanol y biohidrógeno entre otros.

La biomasa ha sido usada como combustible a lo largo de la historia del hombre, pero la demanda energética fue en aumento y conllevó a buscar fuentes energéticas más “abundantes” o bien, más accesibles que la madera, el carbón o el aceite de ballena, por ejemplo; esto resultó en el desarrollo de la industria petrolera, la cual encontró su auge y estabilización con la revolución industrial. Pero debido a los problemas de la disminución de las fuentes del crudo, la inestabilidad política de los países productores y los problemas climáticos, el uso

de biocombustibles ha sido considerado nuevamente como una fuente energética alterna.

Como un recurso limpio y energético renovable, el biohidrógeno es considerado como el combustible del futuro. La producción biotecnológica de hidrógeno ha despertado una amplia atención alrededor del mundo como un proceso ambientalmente amigable (Benemann, 1996; Das y Veziroglu, 2001). La producción de hidrógeno por microorganismos se divide en dos categorías principales: la producción por algas o bacterias fototróficas (Asada y Miyake, 1999) y la producción por fermentación anaeróbica bacteriana (Atif *et al.*, 2005), en la tabla 1 se muestran los procesos fermentativos donde se obtiene una mezcla de gases, incluido el hidrógeno, el cual no se puede emplear directamente, se debe entonces de recurrir a la separación de los gases. Además la acumulación de hidrógeno inhibe la producción del mismo. También es importante la separación para su transportación, almacenaje y uso final (Bélafi-Bakó *et al.*, 2006).

Mucha de la investigación se centra en utilizar algas y bacterias fototróficas (Mahro y Grimme, 1982; Yetis *et al.*, 2000). La producción anaeróbica de hidrógeno ha sido estudiada principalmente a escala en cultivos puros tales como *Clostridium sp.* (Taguchi *et al.*, 1995), *Enterobacter aerogenes* (Rachman *et al.*, 1997; Tanisho y Ishiwata, 1995) y *ectothiorhodospira vacuolata* (Laurie y Roar, 1991). Aunque algunos estudios han sido realizados con mezcla de cultivos de bacterias anaeróbicas (Ueno *et al.*, 1995, Escamilla-Alvarado *et al.*, 2012, Muñoz-Páez *et al.*, 2012, Noparat *et al.*, 2012), la condición óptima para producción de hidrógeno no se ha comprendido plenamente.

La fermentación bacteriana requiere de sustratos tales como glucosa y/o sacarosa para obtener energía, para crecer y mantenerse, produciendo de esta manera varios productos intermediarios tales como ácidos orgánicos, alcoholes y hidrógeno durante la ruta metabólica de degradación tal y como se muestra en la figura 1 (Ren *et al.*, 1997).

Tabla 1. Resumen de procesos biológicos de producción de hidrógeno (adaptado de Reith *et al.* 2003 y Brock y Madigan, 2009)

Proceso	Reacciones	Microorganismos
Biofotólisis directa	$2 \text{H}_2\text{O} + \text{luz} \rightarrow 2\text{H}_2 + \text{O}_2$	Microalgas
Foto-fermentación	$\text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{luz} \rightarrow 4 \text{H}_2 + 2 \text{CO}_2$	Bacterias púrpuras, Microalgas
Biofotólisis indirecta	$6 \text{H}_2\text{O} + 6 \text{CO}_2 + \text{luz} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{O}_2$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{H}_2 + 2 \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{CO}_2$ $2 \text{CH}_3\text{COOH} + 4 \text{H}_2\text{O} + \text{luz} \rightarrow 8 \text{H}_2 + 4 \text{CO}_2$	Microalgas, Cianobacterias
Hidrólisis del agua	$\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$	Bacterias fermentativas Bacterias fotosintéticas
Fermentación en dos fases $\text{H}_2 + \text{CH}_4$	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{H}_2 + 2 \text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{CO}_2$ $2 \text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow 2 \text{CH}_4 + 2 \text{CO}_2$	Bacterias fermentativas + arqueobacterias metanogénicas
Fermentación oscura	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{H}_2 + 2 \text{CO}_2 + \text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 4 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{H}_2 + 2 \text{CO}_2 + 2\text{CH}_3\text{COOH}$	Bacterias fermentativas

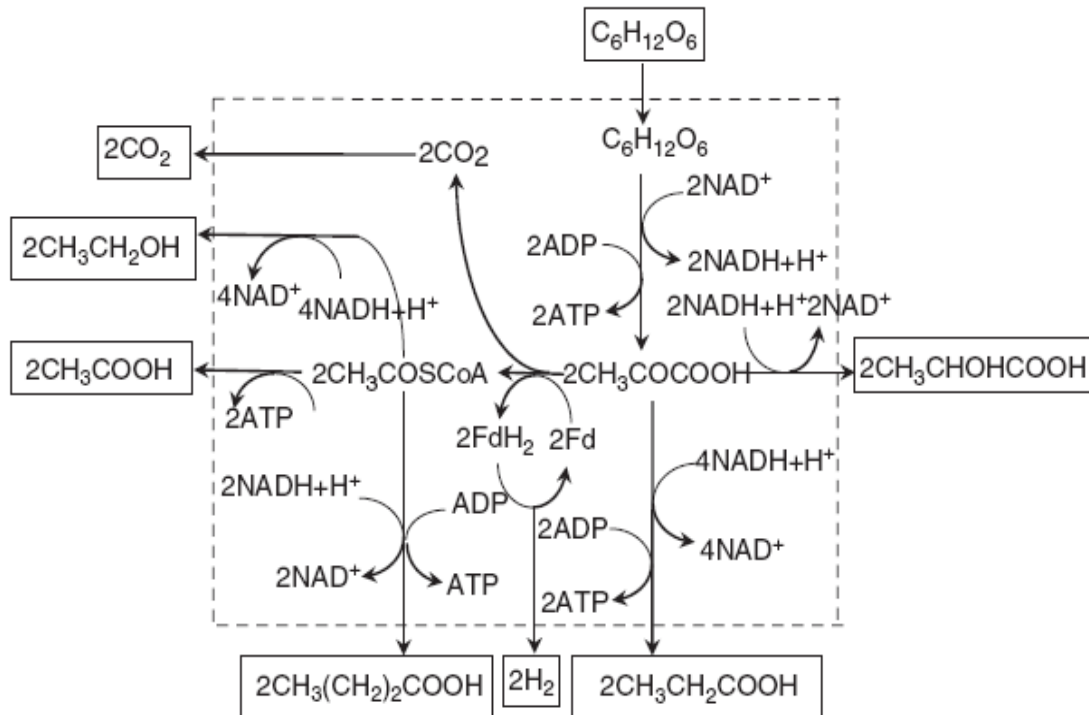


Figura 1. Ruta representativa de la evolución fermentativa de hidrógeno y algunos otros sub-productos (adaptado de Ren *et al.*, 1997).

Por tanto, desechos como aguas residuales, orgánicos municipales así como residuos agrícolas y agroindustriales ricos en carbohidratos pueden ser considerados como posibles fuentes de hidrógeno (Kapdan y Kargi, 2006). El rendimiento de hidrógeno varía proporcionalmente a los productos finales del metabolismo. La producción de los ácidos acético y butírico favorece la producción de hidrógeno (Nandi y Sengupta, 1998; Hawkes *et al.*, 2002), algunas especies de *Clostridium* (sp) pueden producir 2 moles de hidrógeno cuando la fermentación es hacia ácido butírico o 4 moles de hidrógeno si la fermentación es hacia ácido acético, que es el máximo rendimiento teórico de 4 mol de H_2 /mol de hexosa, mientras que los bajos rendimientos de H_2 están asociados con productos finales reducidos como ácidos propiónico, ácido láctico y etanol (Kim *et al.*, 2004; Kyazze *et al.*, 2006; Das, 2009).

En los últimos tiempos los trabajos de investigación se han enfocado a acoplar diferentes sistemas biológicos para aumentar el rendimiento en la

producción de biohidrógeno, enfocando los esfuerzos en la combinación de la fermentación oscura y la fotofermentación llevada a cabo por bacterias púrpura no del azufre, ya que éstas últimas usan como sustrato los metabolitos generados en la fermentación oscura, en la figura 2 se muestra la combinación de estos dos sistemas biológicos así como las demás vías de producción de hidrógeno (adaptado de Kotay y Das, 2008).

1.2.1.2. Fermentación oscura

El aprovechamiento energético de residuos orgánicos por métodos biológicos se suele circunscribir a la producción de metano en procesos de digestión anaerobia. Sin embargo, existen procesos biológicos, como la denominada fermentación oscura, que permiten obtener una mezcla de hidrógeno y metano como producto final de la conversión anaerobia de la materia orgánica, como se puede observar en la tabla 2 (Mohan *et al.*, 2008; Ueno *et al.*, 2007a; Ueno *et al.*, 2007b; Liu *et al.*, 2006; Kyazze *et al.*, 2006; Han y Shin, 2004).

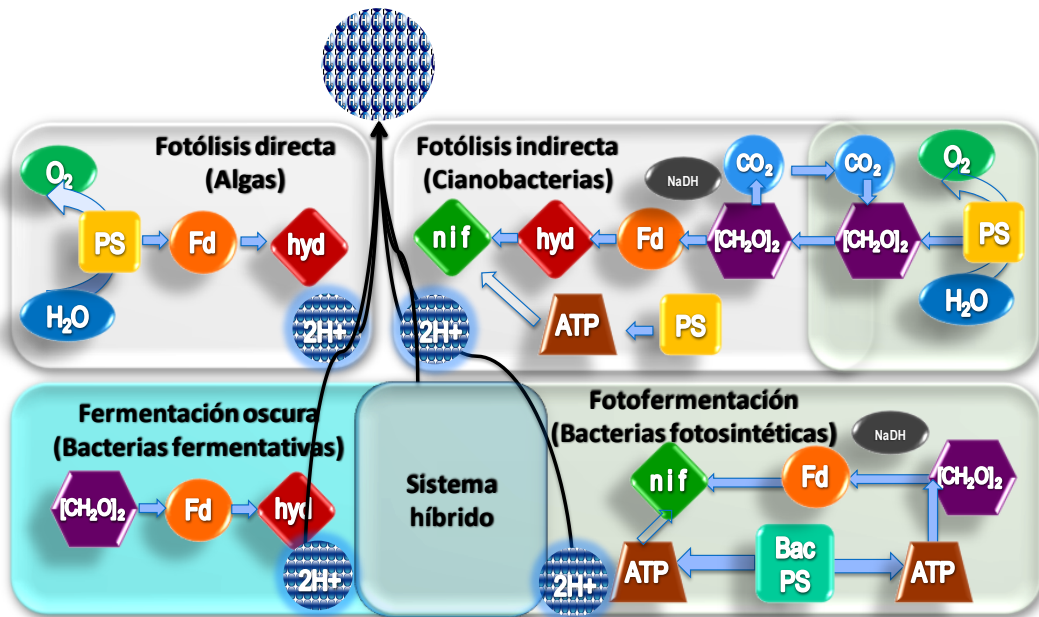


Figura 2. Vías de producción de hidrógeno (adaptado de Kotay y Das, 2008).

El hidrógeno es un producto intermedio en la digestión anaeróbica metanogénica de sustratos orgánicos. Su formación es a través de la fermentación de moléculas simples en la etapa acidogénica y la oxidación de los productos obtenidos en esta etapa hasta ácido acético a través de las bacterias acetogénicas sintróficas (Zhang *et al.*, 2007). Su consumo se debe a la formación de ácido acético vía bacterias homoacetogénicas y de metano en la etapa metanogénica a través de las bacterias hidrógenotróficas.

1.2.1.2.1. *Inhibición de metanogénesis por tratamiento térmico*

Un tratamiento térmico aplicado a la comunidad biológica anaeróbica permite eliminar las bacterias metanogénicas hidrógenotróficas, considerando que estos microorganismos no forman esporas, pereciendo frente a aumentos excesivos de temperatura (Valdez-Vázquez *et al.*, 2006; Mohan *et al.*, 2007), por lo tanto es uno de los medios mas usados para la destrucción de las bacterias y arqueobacterias consumidoras de hidrógeno, sin obtención de metano como producto final de la anaerobiosis. En contraste, las bacterias que producen hidrógeno forman esporas las que pueden volver a su condición de microorganismos vegetativos y metabolizar los nutrientes disponibles (Sung *et al.* 2002). Van Ginkel *et al.* (2001), trataron térmicamente un inóculo natural proveniente de una pila de composta a 104°C por dos horas eliminando la actividad metanogénica del sistema. Sung *et al.* (2002), efectuaron un tratamiento térmico a un lodo proveniente de una planta de gestión de residuos a 100 °C por 15 minutos aumentando la producción de hidrógeno y eliminando la presencia de metano, mostrando que las especies *Clostridium* y *Bacillus* dominaban la población microbiana del biorreactor, por otro lado sometieron a tratamiento térmico un lodo utilizado para producir metano, el tratamiento térmico fue por un período de 90 minutos a 102 °C, obteniendo biogás con hasta 64% de hidrógeno sin presencia de metano.

Tabla 2. Estudios representativos de producción de hidrógeno en fermentación oscura

Proceso	Sustrato	Inóculo	m.o. identificado	Operación	Producción	Observaciones	Ref.
Dos etapas ^a H (60°C) ^b M (55°C)	^c RSOA	Consortio microbiano		TO ^d :25h TRH ^e :0.5d pH:6.0 VO ^f :5L B _v : 37g DQO/L	199mmolH ₂ /L/d 2molH ₂ /molhex 4.4 NLH ₂ /gDQO 442mmolCH ₄ /L/d 16076NLCH ₄ /gDQO	^g RLE Remoción ^h DQO:82% Remoción ⁱ SSV:96% ^j VFA producidos:3984mg/L	1
Dos etapas H (60°C) M (55°C)	^k RSOP	Consortio microbiano	<i>Thermoanaerobacteria thermosaccharolyticum</i> (98%)	^l TO _t :8d TO _H :1.2d TO _M :6.8d VO _H :110L VO _M :340L B _v :18gDQO/L	5.4 m ³ H ₂ /m ³ /d 0.56NLH ₂ /gDQO 6.1 m ³ CH ₄ /m ³ /d	^m IRPR Remoción DQO:79% Remoción SSV:88% 2.4molH ₂ /mol hexosa Clone library, iniciadores: Universal 530f (5`-GTGCCAGCMGCCGCGG-3`) M representa A o C 514-529 E. coli position 1490R (5`-GGTTACCTTGTTACGACTT-3`)	2
Contínuo (35°C)	Sorgo dulce	Consortio microbiano	---	TRH: 4, 6, 8, 12 y 24h VO:0.5 L pH: 4.7-5.5 B _v :8.2-24.8 gSV/d*h	2250mLH ₂ /d 0.37-0.86 molH ₂ /molGlu 0.054-0.12 NLH ₂ /gDQO	ⁿ CSTR 10.4LH ₂ /Kg sorgo Usan azúcares solubles del sorgo	3

Continuación de Tabla 2. Estudios representativos de producción de hidrógeno en fermentación oscura

Proceso	Sustrato	Inóculo	m.o. identificado	Operación	Producción	Observaciones	Ref.
Lote (35°C)	Lodos activados y almidón	Consorcio microbiano	<i>Dialister sp</i> (98%) <i>Selenomonas sp</i> (88%) <i>Prevotella genomom</i> <i>sp.</i> (91%) <i>Veillonella sp.</i> (90%) <i>Cyanothece sp.</i> (93%) <i>Clostridium sp.</i> (91%) <i>Peptostreptococcus</i> <i>sp</i> (91%)	TO:18h °B _v : 5gSSV/L 20gDQO/L pH:5.3	0.18molH ₂ /mol hexosa 0.024NLH ₂ /gDQO	^p ASBR Remoción SSV:60% ^q DGGE, iniciadores: EUB357f (5'-CCTACGGGAGGAGCAG-3') UNIV518r (5'- ATTACCGCGGCTGCTGG-3')	4
Contínuo (60°C)	RSOA	Consorcio microbiano	---	TRH:0.5-6.0d VO:5L pH:5-8 B _v : 18g SSV/L 37gDQO/L	112- 199mmolH ₂ /L/d 0.95-1.01 NL/gDQO	CSTR	5
Contínuo (20, 37 y 55°C)	Residuos de alimentos y estiércol	Consorcio microbiano	---	TRH:2,5 y 8d pH:5.5-6.0 B _v : 7-28 gSV/d	16.5 mL/gSV 0.016 NL/gDQO	Remoción de SV: 93%	6

Continuación de Tabla 2. Estudios representativos de producción de hidrógeno en fermentación oscura

Proceso	Sustrato	Inóculo	m.o. identificado	Operación	Producción	Observaciones	Ref.
Continuo (55°C)	Butirato y estérrico	Consortio microbiano	Bacteria y Archaea (40%) Methanobacteriales y Methanococcales (20%)	CSTR TRH:6d VO: 1L pH:5-7 B _v :2.6gDQO/L	ND	Usan inhibidor de metanogénesis Asumen que H ₂ producido reacciona con CO ₂ para generar acetato ^s FISH, sondas para bacterias: EUB338 y EUB+, sonda para Archaea productoras de CH ₄ : ARC915	7
Lote (30-40°C)	Agua residual y sacarosa	Consortio microbiano	---	pH:4.5-6.0 B _v : 25g sacarosa/L	---	Modelo Gompertz modificado	8
Dos etapas H y M (37°C)	Residuos de alimento	Consortio microbiano	---	^t TRM _H :2d TRM _M :15d VO _H :0.4L VO _M :3L	43 mLH ₂ /gSV 500mLCH ₄ /gSV	CSTR Remoción SSV:86%	9
Dos etapas H y M (28°C)	Agua residual sintética	Consortio microbiano	---	TRH:24h VO _H :1.4L VO _M :1.3L pH _H :6 pH _M :7 B _v :0.975-2.08 KgDQO/m ³ /d	17mmolH ₂ /d 12mmolCH ₄ /d	^u UASB Remoción DQO _H : 37% Remoción DQO _M : 54%	10

Continuación de Tabla 2. Estudios representativos de producción de hidrógeno en fermentación oscura

Proceso	Sustrato	Inóculo	m.o.identificado	Operación	Producción	Observaciones	Ref.
Dos etapas H y M (35°C)	Sacarosa	Consorcio microbiano	---	TRH _H :12d TRH _M :2d VO _H :10L VO _M :17.6L	4.25LH ₂ /L/d 1.39LCH ₄ /L/d	CSTR 189 mLH ₂ /g DQO 323 mLCH ₄ /g DQO Remoción DQO _H : 24% Remoción DQO _M : 90%	11
Dos etapas H y M (37°C)	Residuos de alimento	Consorcio microbiano	---	TRM _H :6d TRH _M :0.6d VO _H :4L VO _M :20L	3.63 m ³ H ₂ /m ³ /d 1.75 m ³ CH ₄ /m ³ /d	RLF + UASB 310 mLH ₂ /gSV 210 mLCH ₄ /gSV Remoción SSV _H : 28% Remoción SSV _M : 70%	12
Lote (28°C)	Agua residual química	Consorcio microbiano	---	TO: 24h VO:4L pH:6 B _v :5-6 KgDQO/m ³ /d	6- 13mmolH ₂ /m ³ /min	^v PDBR Pretratamiento con choque térmico (100°C, 2h) Tratamiento ácido (pH:3, 24h) Remoción DQO: 27-32%	13

Continuación de Tabla 2. Estudios representativos de producción de hidrógeno en fermentación oscura

Proceso	Sustrato	Inóculo	m.o. identificado	Operación	Producción	Observaciones	Ref.
Tres etapas Lote 1er etapa, generación de condiciones anaerobias usando <i>E. coli</i> 2da etapa, FO usando <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 3er etapa, FF usando <i>R. capsulatus</i> DSM 1710	Dátiles podridos	<i>Escherichia coli</i> EGY (1er etapa) <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 (2da etapa) <i>Rhodobacter capsulatus</i> DSM 1710 (3er etapa)	---	Vt: 2L VO: 1.95L 1er etapa 30°C, 100 rpm, TO:12h 2da etapa 30°C, 100 rpm, pH:7 3er etapa 30°C, 100 rpm, 150-200 W/m ² ,	7.8 mol H ₂ /mol sacarosa	Suplementaron 2.5, 5. 10 y 20 g/L de sacarosa al fermentado de los dátiles Con el empleo de la 1ra etapa donde se consume el oxígeno no gasean con argón y abaratan el proceso 1er y 2da etapa se llevan a cabo en oscuridad	14

Continuación de Tabla 2. Estudios representativos de producción de hidrógeno en fermentación oscura

Continuo (37°C)	Agua residual sintética (10gGlu/L)	Consortio microbiano (Lodos activados)	TRH:0.5- 4.0h --- pH:4	0.94molH ₂ /molGlu (TRH:4h) 1-2molH ₂ /molGlu (TRH:0.5-2.0h)	^w AFBR carbón activado como soporte VFA producidos: acetato, butirato, propionato Solventes producidos: etanol, hexanoato	15
--------------------	---------------------------------------	---	------------------------------	---	--	----

Notas: ^aH:hidrógeno, ^bM:metanogénico, ^cRSOA:residuos sólidos orgánicos artificiales (15 g/L comida para perro y 10 g/L residuos de papel), ^dTO:tiempo de operación, ^eTRH:tiempo de retención hidráulico, ^fVO:volumen de operación, ^gRLE:reactor de lecho empacado, ^hDQO:demanda química de oxígeno, ⁱSSV:sólidos suspendidos volátiles, ^jVFA: ácidos grasos volátiles, ^kRSOP:residuos sólidos orgánicos pulverizados (residuos de restaurante y papel), ^lTO:tiempo de operación total, ^mIRPR:Reactor de lecho empacado con recirculación interna, ⁿCSTR: reactor continuo de tanque agitado, ^oB_v:carga orgánica, ^pASBR:anaerobic sequencing batch reactor, ^qDGGE:electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante, ^rND:no detectado, ^sFISH: fluorescente *in situ* hybridization, ^tTRM:tiempo de retención másico, ^uUASB:upflow anaerobic sludge bed reactor, ^vPDBR:biofilm configured periodic discontinuous batch reactor, ^wAFBR:reactor anaerobio de lecho fluidizado. Referencias: 1: Ueno *et al.* 2007a; 2: Ueno *et al.* 2007b; 3: Antonopoulou *et al.* 2008; 4: Arooj *et al.* 2007; 5: Ueno *et al.* 2006; 6: Karlsson *et al.* 2008; 7: Siriwongrungson *et al.* 2007; 8: Mu *et al.* 2007; 9: Liu *et al.* 2006; 10: Mohan *et al.* 2008; 11: Kyazze *et al.* 2006; 12: Han y Shin, 2004; 13: Mohan *et al.* 2007; 14: Abd-Alla *et al.* 2011; 15: Zhang *et al.* 2007.

1.2.1.2.2. *Inhibición de metanogénesis por inhibidores químicos*

Otro método de control o inhibición de la metanogénesis es el uso de inhibidores químicos, éstos pueden ser específicos y no específicos. Dentro de los no específicos se encuentran el acetileno y el cloroformo (Sparling *et al.*, 1997; Valdez-Vázquez *et al.*, 2005). Valdez-Vázquez *et al.* (2005) encontraron que el acetileno al 1% (v/v) inhibe la actividad metanogénica generando un aumento en la producción acumulada de hidrógeno. Anteriormente Sprott *et al.* (1982) evaluaron la inhibición de la metanogénesis empleando acetileno y etileno en varias cepas metanogénicas. Encontraron que el etileno no tiene efecto negativo sobre la metanogénesis, sin embargo el acetileno sí lo tuvo, favoreciendo así el hidrógeno en el metabolismo. Ellos argumentaron que esto se debe a que se pierde la habilidad de mantener el gradiente de pH transmembranal, estimula la actividad de la hidrogenasa y esto hace que no actúe la bomba de protones lo que interfiere en la síntesis de ATP y por lo tanto se no se consume el hidrógeno traduciendo esto en aumento del mismo en el biogás.

1.2.1.2.3. *Efecto de ósmosis y pH sobre los microorganismos*

Otro aspecto de suma importancia y de gran impacto en el metabolismo microbiano, y por tanto en la producción de hidrógeno, es la presión osmótica y el pH. En la ósmosis, la actividad de agua (a_w) es un indicador del agua disponible para los microorganismos; el agua es esencial para los microorganismos ya que la mayoría de los nutrientes requeridos deben estar en forma soluble para que los tomen del medio, el factor crítico es la disponibilidad de agua líquida mas que la cantidad total de agua presente en el ambiente, por lo tanto, la disponibilidad del agua se reduce no solo por efecto de los solutos (fuerzas osmóticas) sino también por la absorción a superficies sólidas (fuerzas matrices u osmosis matricial). El grado de disponibilidad de agua puede expresarse como la a_w , la cual es definida como la presión de vapor de la sustancia o solución entre la presión de vapor de agua destilada (Atlas y Bartha, 2006).

1.2.1.2.3.1. *Efecto de la osmosis sobre el metabolismo microbiano*

La a_w del agua destilada es 1.0, la cual se reduce por la adición de sales y azúcar. La mayoría de los microorganismos requiere valores de a_w entre 0.9 y 1.0, aunque algunos hongos y levaduras pueden sobrevivir a valores de a_w mas bajos en comparación a los valores requeridos por las bacterias ($a_w=0.63-0.85$). Por otro lado, los microorganismos tienen una alta concentración interna de solutos en comparación con el medio acuoso circundante por consiguiente tienen una alta presión osmótica (Hawker y Linton, 1979).

La ósmosis es la difusión del disolvente a través de una membrana semipermeable. La presión osmótica de una solución depende directamente de la concentración de sustancias disueltas en la solución. Dos soluciones con presión osmótica similar se dice que son isotónicas, si dos soluciones con presión osmótica diferentes son comparadas, la que tiene la más alta presión se dice que es hipertónica y la otra hipotónica (Carpenter, 1977).

La presión osmótica del citoplasma de una célula bacteriana normal es mayor que el de los medios de cultivo habituales, es decir, que contiene una mayor concentración de sales, aminoácidos y otros compuestos orgánicos e inorgánicos, esto favorece la entrada de agua al citoplasma y la célula mantiene su estado de turgencia. Por otro lado, si la célula se encuentra en un medio hipotónico pasa un exceso de agua al citoplasma y la célula puede explotar. Por el contrario cuando la célula se encuentra en un medio hipertónico el agua del citoplasma pasa hacia el medio y la célula se contrae, la actividad metabólica cesa y eventualmente muere -una solución de sal o azúcar se puede considerar como un ambiente seco. Bajo estas condiciones las bacterias gram-positivas son mas resistentes que las bacterias gram-negativas ya que las bacterias gram-positivas tienen una presión osmótica interna alrededor de 20 atm y las gram-negativas entre 5-10 atm. La morfología de las células cuando crecen en un medio con una presión osmótica moderadamente alta puede ser atípica, largo, filamentoso, exagerado o hinchado y frecuentemente se encuentran manchas irregulares, es decir puede variar de bacilo a coco y viceversa (Carpenter, 1977; Hawker y Linton,

1979; Brock y Madigan, 1993).

La mayor parte de los organismos son incapaces de adaptarse a condiciones de muy baja a_w y, o mueren o quedan en estado vegetativo. Sin embargo, los microorganismos han desarrollado mecanismos adaptativos que les permiten tolerar la presión osmótica dentro de ciertos márgenes. La mayoría de los microorganismos pueden soportar la presión osmótica baja que predomina en el agua destilada, en el agua de lluvia y en los hábitats de agua dulce, lo hacen elevando la presión intracelular o bombeando activamente al exterior el exceso de agua de la célula (Atlas y Bartha, 2006). Por lo general, con algunas excepciones, los microorganismos no pueden tolerar una presión osmótica alta. Los microorganismos que pueden tolerar altas presiones osmóticas son osmófilos y osmotolerantes los cuales pueden crecer en un amplio rango de a_w . Los osmófilos requieren alta presión osmótica para crecer mientras que los osmotolerantes no requieren alta presión osmótica para su crecimiento pero pueden soportarla, por ejemplo *Staphylococcus aureus* puede crecer en un ambiente por arriba de 3M NaCl. Los organismos capaces de vivir en ambientes fuertemente salinos se llaman halófitos extremos, los capaces de vivir en ambientes muy secos se llaman xerófilos. Cuando un organismo crece en un medio con a_w baja debe realizar un trabajo para extraer agua del medio, sin embargo, la transferencia de agua es estrictamente físico. Así, una célula solamente puede obtener agua incrementando su concentración interna de solutos ya sea bombeando iones del ambiente al interior de la célula o sintetizando algún soluto soluble o compatible (Brock y Madigan, 1993; Atlas y Bartha, 2006; Dharmagadda *et al.*, 2010). Un soluto compatible son compuestos orgánicos de bajo peso molecular como glicerol, algunos azúcares, glutamato, glicina, betaína y otros equilibran la presión osmótica e impiden la pérdida de agua de la célula (Atlas y Bartha, 2006).

En resumen, en la tabla 3 se muestran los valores extremos donde se puede observar vida activa de los microorganismos.

Tabla 3. Valores extremos de los factores ambientales más evidentes bajo los cuales se ha observado vida activa microbiana (adaptado de Scheie, 1970)

Factor	Límite inferior	Límite superior
Temperatura (°C)	-20	104
Actividad de agua	0.48	≈1
Presión osmótica (atm)	0	>40
Salinidad (%)	0	30
pH	0	≈14

Por otro lado, también existe la presión osmótica mátrica. La a_w puede reducirse por efecto de los solutos pero también por absorción en superficies sólidas. Se puede relacionar con el potencial de agua, el cual se mide en megapascales con signo negativo (-MPa) o bares, expresa la presión de succión necesaria para retirar agua del sistema. En el suelo si el potencial de agua es -15MPa las plantas no pueden succionar el agua del mismo y por lo tanto se marchitan, (-15MPs≈0.9 a_w , Atlas y Bartha, 2006). Termodinámicamente, la transferencia se produce de forma espontánea cuando la sustancia i fluye de la región de potencial químico alto a una región de potencial químico bajo o la masa fluye espontáneamente de una posición de alto potencial gravitacional a una de bajo potencial, también se le conoce como tendencia de escape de i . Si el potencial químico de un componente en un sistema es alto, éste tiene gran tendencia de escape, mientras que si es bajo, su tendencia de escape es pequeña (Castellan, 1987).

La disponibilidad biológica de agua generalmente se discute en términos de presión osmótica, esta presión no puede ser medida directamente, se obtiene midiendo la presión hidrostática y numéricamente es equivalente a la presión osmótica de una solución. En una solución real (no ideal) la presión osmótica se mide con la ecuación 1:

$$\pi_s = RT \sum_j \gamma_j c_j = RT \sum_j a_j \quad [1]$$

donde γ_j es el coeficiente de actividad (1 en una solución ideal, <1 generalmente, en otros casos), c_j es concentración y a_j es actividad del soluto (Brown, 1976).

La presión hidrostática es un factor significativo en una situación de transición como en los cambios de concentración de solutos en el ambiente microbiano. El potencial químico μ de una sustancia j se define como la energía libre molal parcial de Gibbs, el cual se calcula con la ecuación 2:

$$\mu_w = \mu_w^\circ + RT \ln a_w + \bar{V}_w P \quad [2]$$

donde μ_w° es el potencial químico de la sustancia j , que puede ser elegida de manera arbitraria, en un estado estándar; a_w es actividad de agua; \bar{V}_w es el volumen molal parcial de la sustancia j ; P es la presión de la solución. La diferencia de potencial, $(\mu_w - \mu_w^\circ)/\bar{V}_w$, también se conoce como potencial de agua y se representa con el símbolo ψ , el cual a su vez es una expresión de la presión osmótica (ecuación 3, Scheie, 1970; Brown, 1976).

$$\psi = \ln a_w (RT/\bar{V}) \quad [3]$$

La presión osmótica, la a_w y por consecuencia el potencial de agua (todos relacionados por la cantidad de sólidos presentes) son factores significativos en el crecimiento microbiano ya que puede limitar la disponibilidad de los nutrientes y la actividad metabólica microbiana. Tradicionalmente, los organismos se han dividido en dos grandes categorías en términos de las adaptaciones al estrés hídrico: osmoconformadores, que suelen utilizar osmolitos orgánicos para mantener la presión osmótica celular igual a la del medio ambiente externo, y osmorreguladores que utilizan el transporte de iones homeostáticamente para regular la presión osmótica interna.

Los solutos orgánicos similares o idénticos a los osmolitos orgánicos también son acumulados por algunos organismos bajo estrés térmico y anhidrobiótico y posiblemente bajo presión hidrostática. Estos solutos son generalmente llamados 'solutos compatibles', basado en el concepto de no

perturbar las macromoléculas celulares, incluso cuando los solutos se encuentran en altas concentraciones. Los solutos compatibles protegen a macromoléculas, membranas celulares y células de los efectos nocivos de la desecación (Carpenter *et al.*, 1990; Rudolph *et al.*, 1986; Louis *et al.*, 1994; Leslie *et al.*, 1994).

La deshidratación de las membranas celulares y de las células produce una transición de fase de la bicapa lipídica. Después de la rehidratación, las membranas experimentan una transición de fase inversa que puede ocasionar la ruptura de la membrana. La protección de las membranas por solutos de bajo peso molecular está relacionada con la substitución de agua entre los grupos de cabeza polares por estos solutos, manteniéndose de esta manera la fase lipídica adecuada cuando se deshidratan estas estructuras.

Algunas bacterias termófilas, hipertermófilas y *Archaea* producen solutos de bajo peso molecular. Generalmente, estos solutos se acumulan intracelularmente durante el crecimiento a temperaturas y/o salinidades supra óptimas, lo cual sugiere que ejercen un efecto protector sobre, al menos, algunos componentes celulares. Se ha demostrado que el soluto compatible, α -manosilglicerato, encontrado en varias bacterias termófilas e hipertermófilas y en *Archaea*, tiene un efecto importante sobre la estabilización de enzimas derivadas de organismos mesófilos y termófilos (Ramos *et al.*, 1997).

1.2.1.2.3.2. *Efecto del pH sobre el metabolismo microbiano*

Hay muchas vías por las cuales el ión hidrógeno ($\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+]$) en el ambiente puede afectar a los microorganismos. El efecto del pH actúa sobre varios factores que se expresan en el crecimiento y reproducción del microorganismo. El estatus nutricional ambiental es afectado notablemente por el pH, altera la adsorción y solubilidad de los iones y la disociación de moléculas, así, de este modo determina su disponibilidad para el microorganismo y conveniencia para el transporte a través de la membrana celular (Hawker y Linton, 1979).

Los microorganismos tienen un intervalo de pH óptimo de crecimiento, que va desde 2.5 hasta 9.0, aunque frecuentemente se acota entre 5.0 y 7.5.

Bacterias como *Thiobacillus thiooxidans* y *Acetobacter* sp. y algunos hongos como *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. son capaces de crecer a pH muy bajo, valores entre 0 y 2, algunos *Bacillus* sp. y cianobacterias pueden crecer a pH 11. Las células están muy bien protegidas internamente contra los cambios de pH, los valores del medio ambiente tienen que ser extremos antes de que el pH intracelular se vea afectado. Las enzimas extracelulares están directamente influenciadas por el pH del medio ambiente (Carpenter, 1977; Mohan *et al.*, 2008).

Las bacterias que se encuentran en el suelo como *Nitrobacter* y *Nitrosomonas* prefieren condiciones de alcalinidad, como se muestra en tabla 4.

Tabla 4. pH mínimo, óptimo y máximo para el crecimiento de bacterias de suelo.

(Adaptado de Carpenter, 1977)

Bacteria de suelo	pH mínimo	pH óptimo	pH máximo
<i>Bacillus subtilis</i>	4.5	6.0-7.5	8.5
<i>Nitrobacter</i>	5.7	8.4-9.2	10.2
<i>Nitrosomonas</i>	7.6	8.5-8.8	9.4
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	1.0	4.0-5.0	9.8

Algunas especies pueden desarrollarse a valores de pH menores a 2 o superiores a 10. El pH bajo afecta la actividad de la hidrogenasa con ion Fe (Cao y Zhao, 2010). El pH tiene un efecto sobre la vía metabólica de algunos microorganismos ya que a pH 6 se favorece la producción de ácido butírico y a pH 7 el de ácido láctico (Cai *et al.*, 2010). Aunque la mayor parte de las bacterias crecen a pH neutro como se observa en la tabla 4, también existen bacterias acidófilas. Las bacterias acidófilas obligadas incluyen varias especies del género eubacteriano *Thiobacillus* y varios géneros de arqueobacterias que incluyen *Sulfolobus* y *Thermoplasma*. *Thiobacillus* y *Sulfolobus* presentan una propiedad interesante: oxidan los minerales de sulfuro y producen ácido sulfúrico. Probablemente el factor más crítico para la acidófila obligada es la membrana plasmática. Cuando el pH se eleva a la neutralidad, la membrana plasmática de las bacterias acidófilas obligadas se disuelve y estas células se lisan, lo cual sugiere que se requieren

altas concentraciones de iones hidrógeno para la estabilidad de la membrana (Brock y Madigan, 1993).

En el metabolismo de los microorganismos anaerobios el hidrógeno es un intermediario que es consumido en la metanogénesis, por lo tanto es necesario inhibir la metanogénesis para la acumulación de hidrógeno, uno de los métodos de inhibición de metanogénesis es el empleo de pH ligeramente ácido (Fang *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004).

1.2.1.2.3.3. *Efecto de presión osmótica y pH en la producción fermentativa de hidrógeno*

Cai *et al.* (2010) encontraron que la concentración de glucosa en la producción de hidrógeno no tiene un efecto significativo, se observó un metabolismo similar para producir hidrógeno independientemente de la concentración inicial de glucosa. Dharmagadda *et al.* (2010) realizaron fermentaciones sumergidas, en sustrato sólido y en sustrato sólido alimentado, la fermentación en sustrato sólido presenta la mayor velocidad inicial de producción de metabolitos a cortos tiempo de incubación (24h) pero esa velocidad se ve disminuida a periodos mas largos de incubación (48h). Cuando las bacterias fermentativas crecen en exceso de sustrato el crecimiento puede ser inhibido por la acumulación de los productos finales de la fermentación, en algunos casos por la inhibición enzimática. La acumulación de ácidos fermentativos baja el pH del medio provocando un ΔpH , este ΔpH genera un intercambio de estos ácidos en su forma protonada que al pasar al citoplasma que esta mas alcalino pasan a su forma anionica y ya no son solubles a la membrana acumulándose en la célula.

Bajo condición hipotónica intracelular, es decir en un medio de baja a_w , muchas bacterias incrementan la concentración intracelular de potasio, glutamato, trihalosa y otros osmolitos. Los osmolitos mantienen las condiciones intracelulares isotónicas y el agua intracelular es retenida. Las células no pueden de forma concomitante aumentar y disminuir el volumen celular, por lo que para un buen desempeño celular es incompatible emplear condiciones de bajo pH y de bajo

contenido de agua (alto contenido de sólidos totales; Baatout *et al.*, 2007). Históricamente el empleo de ambas condiciones se utiliza para prevenir el crecimiento microbiano en los alimentos.

En la mayoría de los trabajos sobre fermentación oscura el contenido de sólidos totales es bajo. Es viable la opción de usar un alto contenido de sólidos totales para la producción de hidrógeno. Sin embargo inadecuados niveles de sólidos totales durante la etapa de acidogénesis pudiera estar afectando negativamente la producción de hidrógeno. Además se debe mantener niveles de alcalinidad y sólidos totales que optimicen una adecuada capacidad amortiguadora de tal manera que se favorezca y se mantenga en el digestor un pH adecuado para la actividad biológica (Valdez-Vázquez *et al.*, 2009; Valdez-Vázquez *et al.*, 2005).

Valdez-Vázquez *et al.* (2009) realizaron un experimento donde evaluaron diferentes contenido de sólidos totales (20-35%) y la alcalinidad en un intervalo de 0.15-0.45 g de fosfato/g de sustrato seco con una superficie de respuesta de puntos centrales, en todos los tratamientos, fueron 12 reactores que operaron durante 96 días. Obtuvieron en promedio 52-65% de hidrógeno sin diferencia significativa. Altos niveles de alcalinidad y sólidos totales afecta negativamente la productividad y el rendimiento de hidrógeno, los ST afectan de manera más significativa. Ambas variables (productividad y rendimiento) se incrementan conforme decrece la cantidad de ST. A $ST < 20\%$ la ventaja de fermentación en estado sólido se pierde. Un exceso de alcalinidad ($\gamma > 0.375$) afecta de manera negativa el proceso biológico, probablemente debido a estrés osmótico. Es posible que se incremente un efecto osmótico relacionado con la materia seca del sustrato más altos niveles iónicos debido a la suplementación de amortiguador, el cual podría causar daño celular.

Es importante resaltar que la producción de hidrógeno disminuyó drásticamente en los digestores acidogénicos a $\gamma > 0.40$ y $ST > 30\%$. Se encontró que la máxima remoción de SV fue a 32% de ST, lo que sugiere que la degradación de sustrato esta llevándose por una vía metabólica que no genera hidrógeno, esto supone que altas remociones no esta asociado con alta

productividad y alto rendimiento de hidrógeno. El pH óptimo de trabajo fue 5.8 alcanzado a $\gamma=0.26$. El pH es una variable clave que ha sido estudiada exhaustivamente para producción de hidrógeno en sistemas fermentativos, sin embargo se ha reportado pH de 5.6-6.5 como óptimos para la producción de hidrógeno (Mohan *et al.*, 2007).

El control efectivo del pH durante la operación de los digestores es crucial para evitar caídas bruscas de pH lo cual provoca vías metabólicas no deseadas (solventogénesis). Se sabe que los ácidos no disociados son más tóxicos para la célula que los disociados razón por la cual el amortiguador debe mantener el pH mas alto que el pK_a y así mantener una proporción alta de los ácidos orgánicos disociados en los digestores.

Los sistemas anaeróbicos productores de hidrógeno operan con o sin control del pH del medio. Kumar *et al.* 2000, demostraron que operando un sistema con control de pH la producción de hidrógeno aumenta en un 11% con respecto a un sistema sin control. En general, el rango de pH óptimo para la producción de hidrógeno está entre 5.0 y 6.0.

En cuanto a valores de pH, las condiciones ligeramente ácidas parecen ser las más favorables. Fang y Liu (2002), evaluaron el efecto del pH sobre la producción de hidrógeno en un sistema continuo, el intervalo de pH fue de 4-7 con aumentos de 0.5. Encontraron que a pH 5.5 se logra producir 2.1 mol- H_2 /mol-glucosa con una remoción de glucosa del 90%, estos autores junto con Kumar y Das (2000) son de los pocos estudios donde evalúan la influencia del pH en la producción de hidrógeno.

Por otro lado, existen estudios que trabajan con control de pH (Kumar y Das, 2000; Van Ginkel *et al.* 2001), dicho control o regulación del pH es a través de soluciones amortiguadoras (Logan *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2003) y sin control de pH (Sung *et al.*, 2002; Zhang *et al.* 2003), pero existe poca literatura que reporte un trabajo que compare, sistemas con y sin regulación del pH inicial a través de un sistema amortiguador. En este contexto, es importante realizar estudios comparando el efecto del pH en un sistema anaeróbico mesofílico (37 °C) y termofílico (55 °C).

Muñoz-Páez *et al.* (2008), realizaron un ensayo presuntivo de la comparación de estrategias de manipulación del pH inicial, a dicha estrategia la llamaron “pH intervenido y no intervenido”; con la estrategia de pH intervenido se obtiene 1.4 veces mayor producción acumulada de H₂ que con la estrategia de pH inicial sin intervenir. Con ambos tratamientos se obtuvo un tiempo lag corto (<72 h), donde el metabolito predominante en ambos tratamientos fue ácido acético. También realizaron un experimento de FASSH-VI donde emplearon como sustrato una mezcla de torta industrial de jugo (TIJ) y fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU) usando la estrategia de pH intervenido, con pH intervenido a 6.5 se obtuvo 2.3 veces mayor producción de hidrógeno que a pH 6.0 y 1.3 veces mayor producción de H₂ que a pH 5.5. El metabolito predominante a los 3 valores de pH fue ácido láctico, así mismo realizaron un experimento de FASSH-VI con la mezcla de TIJ y FORSU empleando la estrategia de pH inicial no intervenido (o también llamada fermentación libre, FL) a pH 7.4 se obtuvo 11.8 veces mayor producción acumulada de H₂ que a pH 6.5. La estrategia de pH inicial FL a pH 7.4 y 7.0 obtuvo un tiempo lag corto (<24 h), donde el metabolito predominante en los tres tratamientos fue ácido láctico y solo se observó un ciclo de producción de H₂. En general se obtiene mayor producción de hidrógeno con la estrategia de pH intervenido que con la de pH inicial FL.

Como se ha mencionado anteriormente la producción de hidrógeno vía fermentativa oscura ha sido muy estudiada, proporciona una solución a dos problemas, por un lado produce energía limpia y por otro proporciona tratamiento los residuos orgánicos. Sin embargo, durante la fermentación oscura se convierte no más del 40% de la energía química de los contaminantes orgánicos a hidrógeno (Li *et al.* 2008) y se producen ácidos orgánicos y alcoholes, los cuales pueden ser aprovechados para generar más hidrógeno. Estudios plantean que el proceso fototrófico es capaz de convertir esos ácidos orgánicos y alcoholes completamente a hidrógeno.

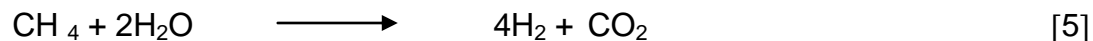
1.2.1.3. Fermentación fotoheterótrofa

La producción de hidrógeno por biofotólisis, también citada como fotodisociación biológica del agua, se refiere a la conversión de agua y energía solar (utilizada) a

hidrógeno y oxígeno usando microorganismos, comúnmente microalgas y/o cianobacterias. Si bien la producción biológica de hidrógeno ha sido un campo de activa investigación tanto aplicada como básica por al menos dos décadas, su producción industrial se realiza por hidrólisis eléctrica de agua (ecuación 4):



o por reacciones químicas desde gas metano (que se obtiene como combustible fósil, aunque su producción por microorganismos es muy común, ecuación 5):



Estas dos estequiometrias (la ecuación 5 es solamente global; pues, en realidad, se trata de dos reacciones secuenciales) corresponden a procesos existentes, bien caracterizados y conocidos, de modo que se pueden obtener mayores detalles en el ámbito comercial.

La producción biofotolítica, en cambio, dista mucho aún de expresarse comercialmente, pues requiere de un significativo avance científico (*i.e.*, ocurre) y tecnológico (*i.e.*, intervenir la maquinaria bioquímica).

Durante esta última década se han realizado significativos avances en este campo, tanto en la caracterización bioquímica de los microorganismos que producen hidrógeno (Melis *et al.*, 2000; Borodin *et al.*, 2000) bajo condiciones adecuadas (anaerobiosis y separación temporal en la producción de oxígeno e hidrógeno), como en el manejo fisiológico de los cultivos (Melis *et al.*, 2000; Wykoff *et al.*, 1998). Además, se han propuesto diseños de fotobiorreactores (reactores en que se desarrollan reacciones biológicas controladas, que son cerrados pero que permiten la interacción del material biológico con radiación luminosa) más eficientes para la obtención de biomasa con rendimientos cercanos al 10% en términos de la energía radiante recibida versus la expresada como hidrógeno (Morita *et al.*, 2000; Jenssen *et al.*, 2000).

1.2.1.3.1. Bacterias púrpura no del azufre (BPNA)

Las bacterias púrpuras o bacterias púrpuras fotosintéticas son proteobacterias de las subdivisiones alfa y beta, también se encuentran en esta clasificación otro tipo de bacterias como *Nitrobacter*, *Pseudomonas* y *Zymomonas* entre otras que no son BPNS. Los géneros de BPNS incluidos en la subdivisión alfa son *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter*, *Rhodovulum*, *Rhodomicrobium*, *Rhodopila* y *Rhodobaca*. Los géneros incluidos en la subdivisión beta son *Rhodocyclus*, *Rubrivivax* y *Rhodoferax*. Todas son gram negativas (figura 3, Madigan *et al.*, 2009) y fototrofas anoxigénicas, es decir, son capaces de producir energía a través de la fotosíntesis, poseen solo un sistema fotosintético y obtienen el poder reductor para la fijación del CO₂ a partir de alguna sustancia reducida del ambiente que pueden ser un compuesto orgánico, un compuesto reducido de azufre o H₂. Poseen pigmentos de bacterioclorofila a o b (figura 4), junto con varios carotenoides. Estos les proporcionan colores que incluyen el púrpura, rojo, marrón y naranja. La fotosíntesis tiene lugar en centros reactivos sobre la membrana celular, la cual se dobla dentro de la célula para formar sacos, tubos u hojas, incrementando la superficie disponible (Bitton, 2002).

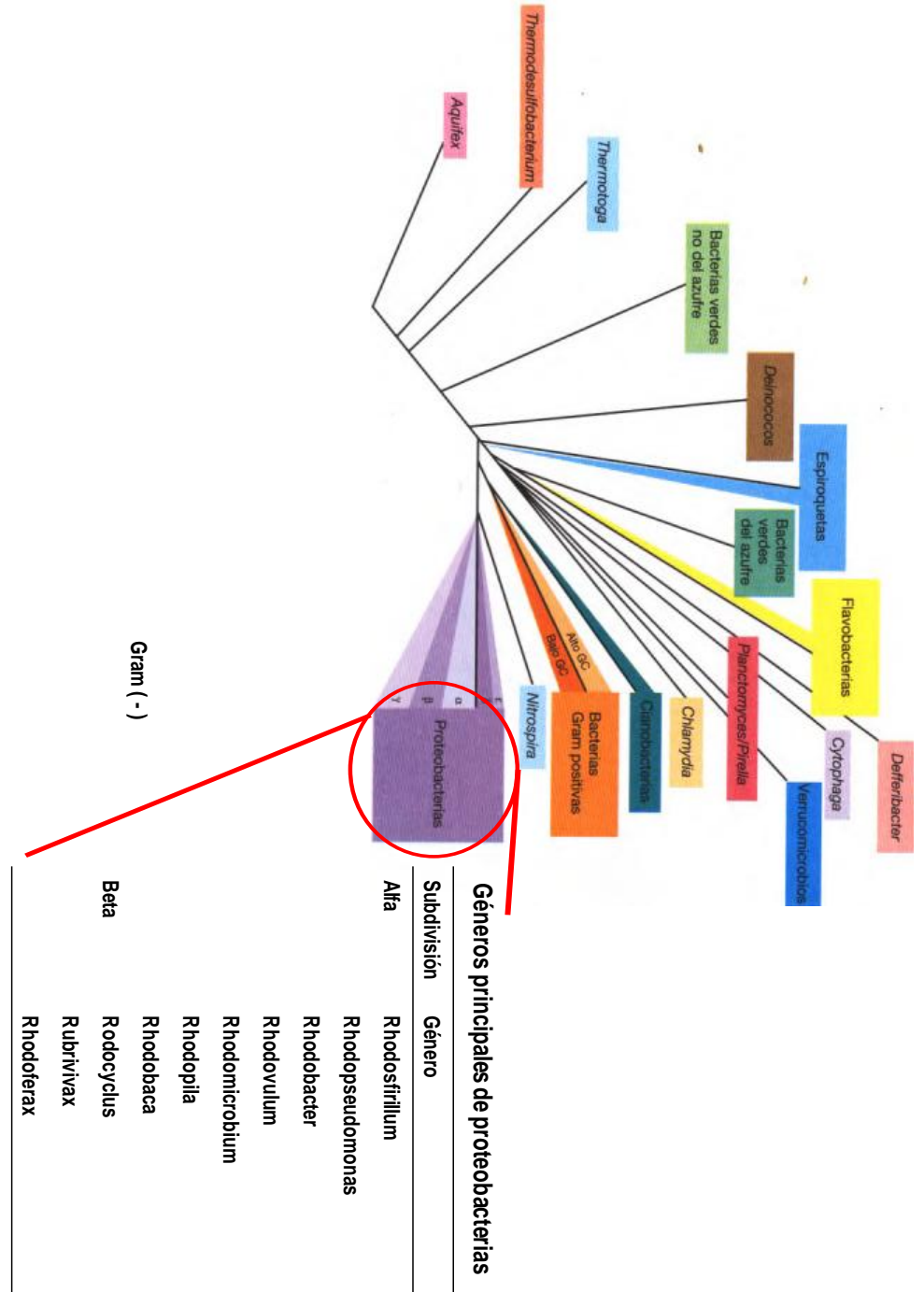


Figura 3. Géneros principales de las BPNS (adaptado de Brock y Madigan *et al.*, 1993).

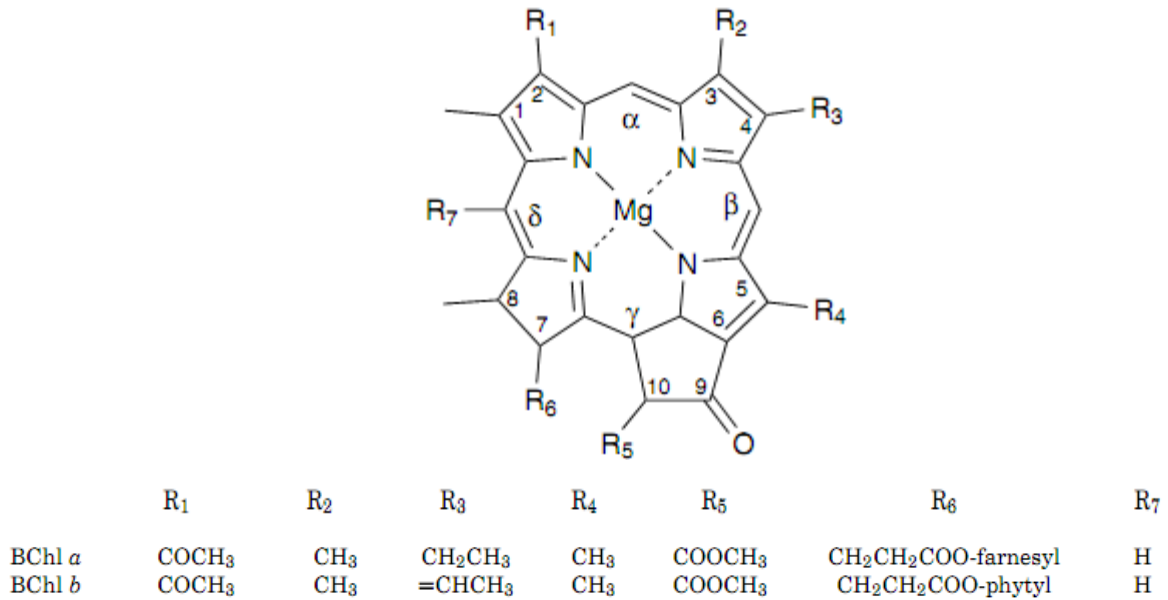


Figura 4. Estructura de las bacterioclorofilas conocidas de las BPNS (tomado de Bitton, 2002).

Como la mayoría de las demás bacterias fotosintéticas, las bacterias púrpuras no producen oxígeno porque el agente reductor implicado en la fotosíntesis no es el agua, lo que es una ventaja ya que el oxígeno es un fuerte inhibidor de la hidrogenasa (Akkerman *et al.*, 2002).

En algunas bacterias llamadas púrpuras del azufre, el agente reductor es sulfuro o azufre; en las BPNS el agente reductor típicamente es hidrógeno aunque algunas pueden utilizar otros compuestos en cantidades pequeñas. En el pasado los distintos grupos eran consideradas familias, pero los árboles de ARN indican que las bacterias púrpuras comprenden una variedad de grupos separados, cada uno más relacionado con proteobacterias no-fotosintéticas que con los otros grupos.

Para la producción de hidrógeno por bacterias fotosintéticas es necesario conocer su metabolismo. La producción de hidrógeno por BPNA requiere de iluminación y llevarse a cabo en condiciones anaerobias. El hidrógeno se genera a partir del rompimiento de sustratos orgánicos, con una relación C/N alta (Levin *et al.* 2004). El sistema de producción global de H₂ consta de: (i) el sistema de enzimas, (ii) el flujo de carbono, específicamente el ciclo TCA y (iii) el aparato

fotosintético de membrana, todos interconectados dentro del esquema de la producción de hidrógeno por medio del intercambio de electrones, protones y ATP (Koku *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2011; figura 5). La producción de hidrógeno por las BPNA ocurre generalmente por fotoheterotrófia, sin embargo, las BPNA son capaces de metabolismos alternativos como la respiración aeróbica/anaeróbica, la fermentación y la fotoautotrófia. Koku *et al.* (2002) observaron el consumo de sustrato en los periodos de oscuridad, indicando un metabolismo fermentativo.

La mayoría de los estudios de producción de biohidrógeno vía fotoheterótrofa proponen el uso de BPNS que utilizan como fuente de carbono ácidos orgánicos y solventes (tabla 5), que se producen en la fermentación oscura, esto bajo condiciones de iluminación, por lo que la fotofermentación es un excelente complemento de la fermentación oscura en la producción de hidrógeno.

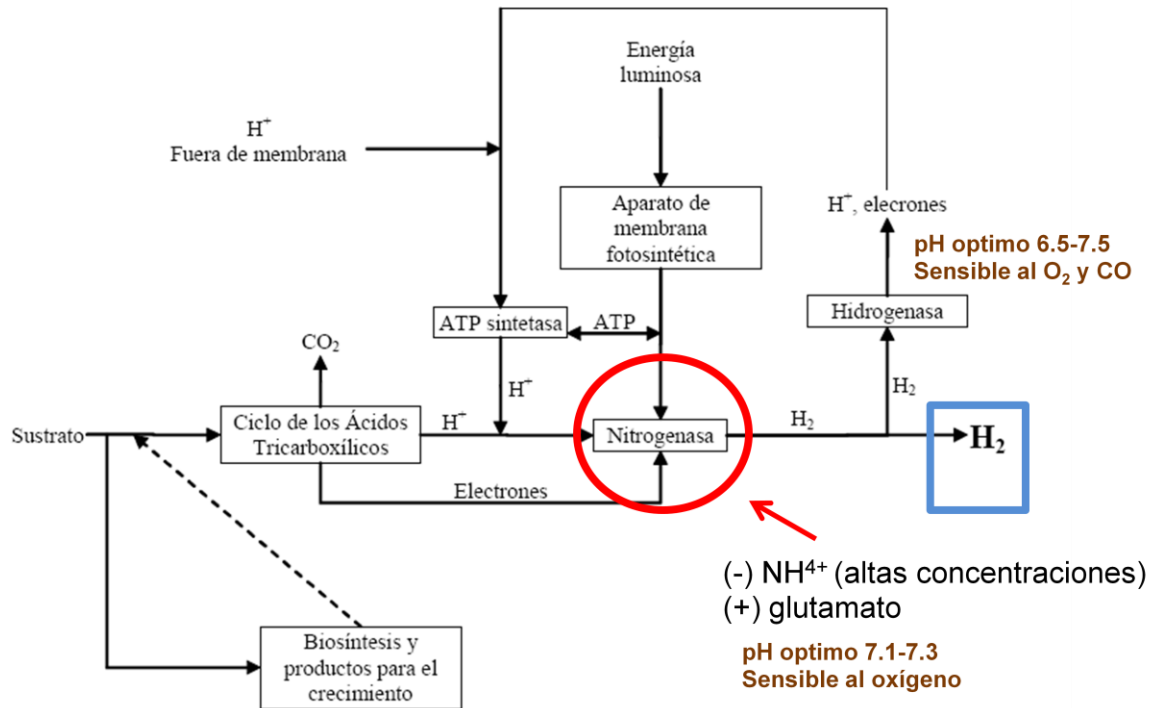


Figura 5. Sistema global de producción de hidrógeno en las BPNS (adaptado de Koku *et al.*, 2002).

Bajo este contexto, la fermentación oscura produce ácidos orgánicos que en los efluentes líquidos no son deseables porque baja la calidad del agua, las BPNS puede usar estos ácidos, entre otras fuentes de carbono en su metabolismo (Li y Fang, 2008; Tao *et al.*, 2008; Modigell *et al.*, 2008).

Las BPNS puede convertir la mayoría de ácidos orgánicos en hidrógeno y dióxido de carbono en condiciones de iluminación. En la fermentación, la oxidación completa de 1 mol de glucosa tendría un rendimiento de 12 moles de hidrógeno como se muestra en la ecuación 6 (Levin *et al.*, 2004; Akkerman *et al.*, 2008). Sin embargo, la oxidación completa de la glucosa en hidrógeno y dióxido de carbono, termodinámicamente no es posible, además hasta ahora no se sabe de algún microorganismo que pueda llevar a cabo la ecuación 6, si esta reacción fuera posible se requerirían 4 ATP para generar 1 mol de H₂ (Wu *et al.*, 2012) y si la hidrólisis de un ATP proporciona -31 KJ/mol (Lehninger, 1978), esta reacción requeriría una energía de activación de -236 KJ/reacción.

Tabla 5. Estudios representativos de producción de hidrógeno en fotofermentación

Proceso	Sustrato	m.o. identificado	Operación	Resultados	Observaciones	Ref.
Lote (30°C) V _i =38mL	Ácidos orgánicos Solventes	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (99.7%)	pH:7 rpm:400 iluminación:4000 lux	118mL/L/h P _{H₂} ^a : 126mmol/L Y' _{H₂} ^b : 1.37 mmolH ₂ /gDQO _i	C _i ^c (g/L): Succinato: 6, Malato: 7, Acetato: 2, Butirato: 5, PCR, clonado en vector-T, Iniciadores: P0-GAGAGTTTGATCC P6-CTACGGCTACCTTG- TTACGA Bacteria aislada de agua residual municipal	1
Lote (30°C) V _i =125 mL	Carbohidratos Ácidos orgánicos	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> (99.6%)	pH:7.1-7.2 iluminación:200W/m ²	P _{H₂} : 1.8mLH ₂ /mL, 0.08molH ₂ /L Y' _{H₂} :0.19molH ₂ /gLac η _{H₂/sust} = 0.2%	C _i (g/L): Succinato: 3.5, Malato: 7.0, Acetato: 1.8, Butirato: 3.2, Almidón: 4.5, Láctico: 0.43, PCR, iniciadores: EUB8F (5`AGTTTGATCMTGGCTCAG), 1492R(5`GGTTACCTTG- TTACGACTT)	2

Continuación de Tabla 5. Estudios representativos de producción de hidrógeno en fotofermentación

Proceso	Sustrato	m.o. identificado	Operación	Resultados	Observaciones	Ref.
Continuo (30 °C)	Extractos acidogénicos de la fermentación obscura	<i>Rhodobacter sphaeroides RV</i>	TRH ^d : 25h pH: 7.2 iluminación: 10 klux.	100mLH ₂ /g _{ps} ^e /h P _{H₂} : 32-320 mLH ₂ /L Y _{H₂} : 6.32-63.2 mLH ₂ /gDQO	C _i (g/L): lactate: 4-5, acetate: 0.4 B _v : 0.45 g _{lactato} /l/d, 0.04 g _{acetato} /l/d	3
Lote (32°C)	Ácido málico Butírico,	<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	pH 6.8 iluminación:4 klux	14.5 mLH ₂ /L/h P _{H₂} : 1044 mLH ₂ /L Y _{H₂} : 3.26 mLH ₂ /g _{psbiomasa}	C _i : 3 mM malato	4
Lote (30°C)	Ácido acético Ácido Butírico	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	pH: 8-9 iluminación: 200w/m ² ,	2.5 molH ₂ /mol acetato 3.7molH ₂ / mol butírico η _{H₂/sust} = 27.5-52.5%	C _i (mg/L): acetate: 800-4100, propionate: 1000-5100 Producción usando acetato fue a pH 8 Producción usando butírico fue usando pH 9	5
Lote (32°C)	Ácido butírico Ácido glutámico	<i>Rodopseudomonas palustris WP3-5</i>	pH: 7.1 rpm:100 iluminación:10klx	24.9mLH ₂ /L/h P _{H₂} : 5.5 mLH ₂ /molHBut Y _{H₂} : 1743 mLH ₂ /L	C _i (mg/L): ácido butirico: 1832, ácido glutámico: 607 V _{op} : 100 mL T _{op} : 70 h	6

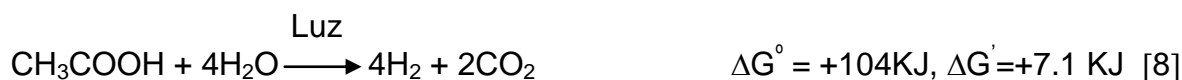
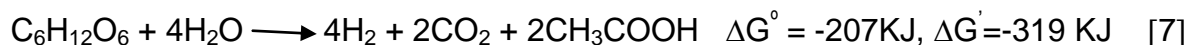
Continuación de Tabla 5. Estudios representativos de producción de hidrógeno en fotofermentación

Proceso	Sustrato	<i>m.o. identificado</i>	Operación	Resultados	Observaciones	Ref.
Continuo	Ácido	<i>Rhodobacter</i>	pH:7.2	75 mLH ₂ /g _{ps} /h	C _i : 100 mM ácido	7
2 etapas: etapa 1: consumo de nitrógeno por crecimiento bacteriano, Etapa 2: hidrógenogénica (30°C)	láctico	<i>sphaeroides</i> RV	Iluminación:10 klux TRH: 15h 30°C V _{op} : 1L	1.4-1.6 LH ₂ /L/d Y' _{H₂} : 197mLH ₂ /gDQO P _{H₂} : 1.9 LH ₂ /L η _{H₂/sust} = 80%	láctico B _v : 6.67mmolHLac/L/h	
Lote	Ácido acético, propiónico, butírico y valerato	<i>R. sphaeroides</i> , <i>Rb. capsulata</i> , <i>Rhodopseudomonas</i> <i>palustris</i> , <i>Rhodospirillum rubrum</i> , <i>ecuacióntothiorhodospira</i> <i>shaposhikowii</i> .	V _{op} : 1.5 L pH: 7.0 Luz azul (500–700 nm)	176-5.18 mLH ₂ /g/L Y' _{H₂} : 338-995 mLH ₂ /g _{sustrato} P _{H₂} : 50- 55molH ₂ /L	C _i (g/L): acetate: 2.8, propionate: 2.9, butirato: 1.9, valerato: 1.3	8

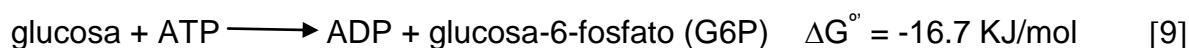
Nota: ^aP_{H₂}: Producción de hidrógeno, ^bY'_{H₂}: Pseudorendimiento de productividad de hidrógeno, ^cC_i: concentración inicial, ^dTRH: tiempo de retención hidráulico, ^eg_{ps}: gramos en peso seco.

Referencias: 1: Tao *et al.*, 2008; 2: Li y Fang, 2008; 3: Fascetti *et al.* 1998; 4: Sasíkala *et al.* 1990; 5: Fang *et al.* 2005; 6: Chun-Ye *et al.* 2007; 7: Fascetti *et al.* 1995; 8: Takabatake *et al.*, 2004.

Como se sabe y se ha mencionado con anterioridad, en la fermentación oscura la producción de hidrógeno generalmente va acompañada por la producción de ácidos grasos volátiles y alcoholes (Valdez-Vázquez *et al.*, 2005; Fang *et al.* 2006) con un máximo de 4 moles de hidrógeno por mol de glucosa consumida (ecuación 7) si se obtuviera el acetato como único producto (Valdez-Vázquez *et al.*, 2005; Levin *et al.*, 2004; Manish y Banerjee 2008). El acetato producido en la fermentación oscura puede ser oxidado por bacterias fotosintéticas (ecuación 8) para producir hidrógeno (Levin *et al.*, 2004; Manish y Banerjee, 2008).



Los valores positivos de ΔG° y $\Delta G'$ predicen que la reacción no ocurre de manera espontánea, y debería acoplarse a alguna reacción altamente exérgonica, como:



Aún cuando termodinámicamente no es factible, Woodward *et al.*, (2000); reportan la obtención de 11.6 mol de H_2 /mol G6P, acoplado las enzimas del ciclo de fosfato de pentosa oxidativa con hidrogenasa purificada a partir de la bacteria *Pyrococcus furiosus*, uno de las pocas hidrogenasas que utilizan NADP^+ como acarreador de electrones. El hidrógeno producido por esta vía es el producto principal de un proceso *in vitro*, a diferencia del producido por las vías metabólicas intermedias de fermentación bacteriana.

1.2.1.3.2. Uso de fotobiorreactores en la producción de hidrógeno

Algunos microorganismos pueden capturar la energía solar, en biorreactores, como las algas, cianobacteria, bacterias púrpura fotosintéticas. La producción fotofermentativa de hidrógeno es relativamente lenta en comparación con la fermentación oscura, debido principalmente a la baja tasa de crecimiento de las bacterias fotosintética y la baja eficiencia en la conversión de la energía luminosa (Chen *et al.* 2006).

Se han empleado varias estrategias para aumentar la velocidad de producción de hidrógeno. Los biorreactores tienen algunas limitaciones que afectan la actividad biológica, de las más significativas es la penetración de luz (Gressel, 2008). Para lograr una mayor eficiencia de la penetración y uso de luz en los fotobiorreactores, Terry (1999), demostró que la rápida circulación de las algas, coloca algunos especímenes en la sombra de otros y evita la fotoinhibición. Por otro lado, el uso de fibra óptica puede difundir la luz a través del medio, evitando así una alta irradiación superficial (Gressel, 2008). Las bacterias anaerobias fotosintéticas pueden utilizar la porción de luz solar cercana al infrarrojo para producir hidrógeno, mientras consumen ácidos orgánicos y solventes. Melis *et al.* (2006) propusieron un sistema de co-cultivo de algas verdes unicelulares y bacterias púrpura fotosintéticas, la fotosíntesis de algas verdes es impulsada por luz visible, las bacterias púrpura absorben la parte cercana al infrarrojo, como se menciono anteriormente. El sistema propuesto usa solo bajas intensidades de luz.

Fascetti y Todini (1995), utilizaron *Rhodobacter sphaeroides* RV y evaluaron la producción de hidrógeno en un sistema de una y dos etapa (figura 6). Emplearon ácido láctico como sustrato en una concentración inicial de 100mM. La saturación luminosa se observó cuando se aplicaron intensidades iguales o superiores a 10 klux. El fotobiorreactor se iluminó con dos lámparas de tungsteno de 100W, colocadas dentro del reactor. En condiciones de saturación luminosa el sistema en dos etapas parece ser muy eficaz en la producción de hidrógeno, teniendo la ventaja sobre el sistema de una etapa de la eliminación completa de

compuestos nitrogenados en el primer reactor. La eliminación completa de los compuestos nitrogenados se logró mediante el crecimiento bacteriano, o sea por síntesis, empleando fotobiorreactores con agitación continua.

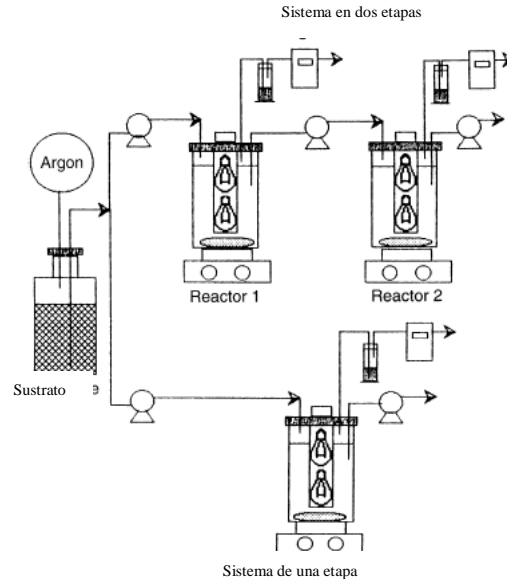


Figura 6. Sistemas de una y dos etapas para la producción de hidrógeno usando *Rhodobacter sphaeroides* RV (adaptado de Fascetti *et al.* 1995).

Takabatake *et al.* (2004), llevaron a cabo experimentos en lote, utilizando un fotobiorreactor delgado de cara plana de vidrio (figura 7a) inoculado con un cultivo mixto de bacterias fotosintéticas productoras de hidrógeno. Encontraron que la velocidad de producción de hidrógeno fue de 1.76-5.18 mL/g/h con remoción de amoníaco. Por otro lado, Zabut *et al.* (2006) utilizaron también un fotobiorreactor delgado de cara plana (figura 7b) de 400 mL de capacidad.

El reactor fue iluminado utilizando una lámpara de tungsteno de 150W. Los autores evaluaron un sistema combinado de *Rhodobacter sphaeroides* OU001 y *Halobacterium salinarum* y encontraron que la eficiencia de conversión de luz aumentó de 0.6% a 2.25%; la tasa de producción de H₂ fue 360-1500L/L/h.

Lata *et al.* (2007), utilizaron un fotobiorreactor de 300 mL (figura 8a), evaluaron la eficiencia de conversión luz. Este parámetro es la relación entre el valor total de la energía del hidrógeno que se ha obtenido, y la energía total de

entrada al fotobiorreactor por luz solar o irradiación; cuando *Halobacterium halobium* NCIM2852 se expuesto a la luz solar la tasa de producción de hidrógeno

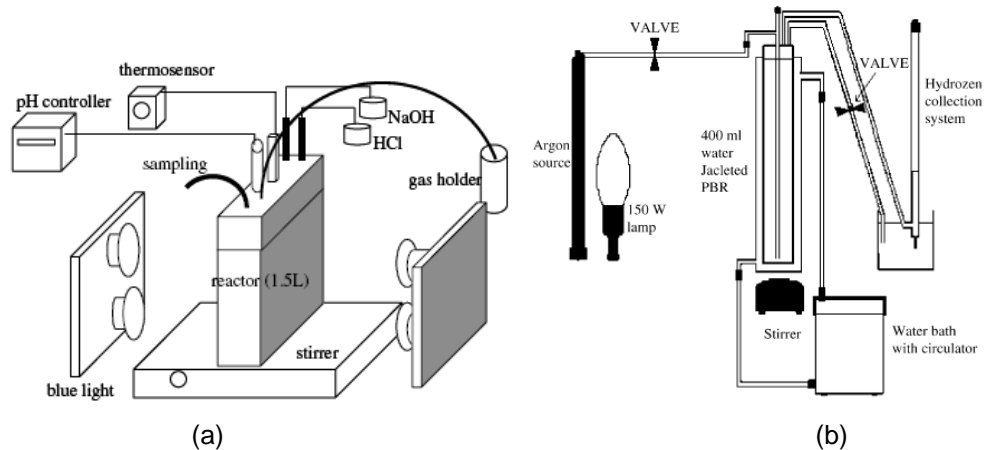


Figura 7. Fotobiorreactores de cara plana empleados por: (a) Takabatake *et al.* (2004), (b) Zabut *et al.* (2006)

se incremento de 0.1602 ± 0.0215 a 1.002 ± 0.209 L/h con el correspondiente aumento de la intensidad solar incidente del 3 al 7 de kWh/m² con una superficie expuesta de 3.84×10^{-3} m² del biorreactor.

Por otro lado, He *et al.* (2005), evaluaron el desempeño de cuatro diferentes cepas mutantes de *Rhodobacter capsulatus* utilizando un fotobiorreactor (similar a la presentada en la figura 8a), de 3 L de capacidad, pero acoplado a una celda de combustible PEM (membrana de intercambio protónico, por sus siglas en inglés). Obteniendo aproximadamente 95% de hidrógeno en el biogás producido promedio a partir de las diferentes cepas de *R. capsulatus* pero no reportan eficiencia de conversión de la luz.

Chen *et al.* (2006), emplearon un fotobiorreactor novedoso para la producción de hidrógeno; iluminado por una combinación de fibra óptica y otras fuentes de luz convencionales. Se demostró que la iluminación con fibra óptica fue

eficaz en la producción de hidrógeno, empleando *Rhodospseudomonas palustris* WP3-5.

El sistema de iluminación consta de una combinación ternaria de fibra óptica, lámpara de halógeno y tungsteno (figura 8b), con una velocidad máxima de producción de hidrógeno de 38.2 mL/L/h y un rendimiento de hidrógeno de 3.15 molH²/mol acetato y una conversión de luz de 1.93%

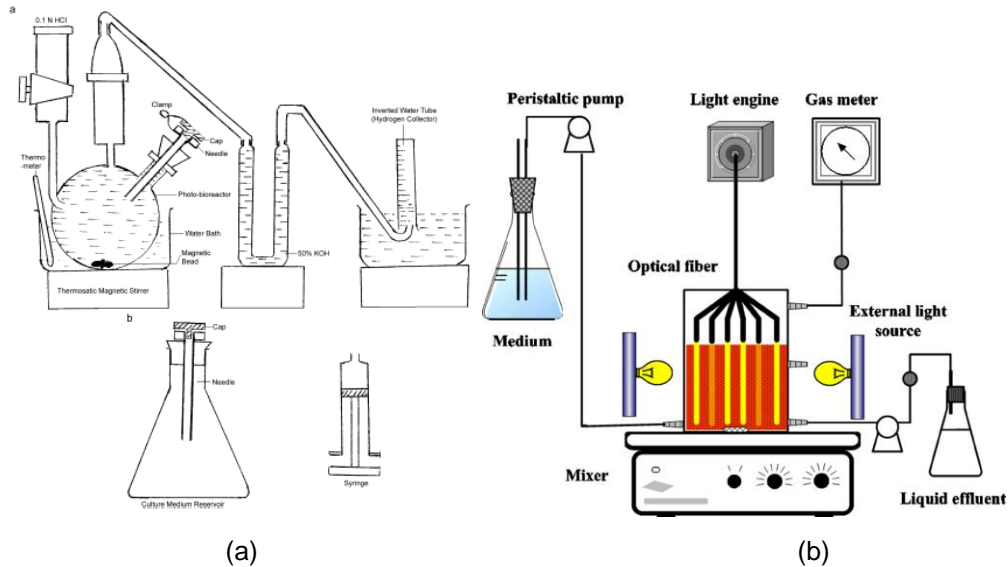


Figura 8. (a) Esquema de fotobiorreactor empleado por Lata *et al.* (2007); (b) Esquema de fotobiorreactor equipado con fuente luz interna (fibra óptica) y externa (lámpara de halógeno y tungsteno) empleado por Chen *et al.* (2006)

1.3. Región de la Cuenca del Papaloapan del Estado de Veracruz

En el estado de Veracruz, la cuenca del Papaloapan no solo es una región hidrográfica, se ha aprovechado para formar también una delimitación político económica, que se le denomina Región del Papaloapan, está integrada por 22 municipios (INEGI, 2005), los cuales son: Tierra Blanca, Ignacio de la Llave, Alvarado, Tres Valles, Cosamaloapan, Ixmiquilpan, Acuña, Tlacotalpan, Saltillo, Lerdo de Tejada, Ángel R. Cabada, Otatitlán, Tlacojalpan, Tuxtilla,

Chacaltianguis, Carlos A. Carrillo, Amatitlán, José Azueta, Isla, Juan Rodríguez Clara, Playa Vicente y Santiago Sochiapa (figura 9).

La Cuenca del Papaloapan está integrada por una superficie de 741,053 hectáreas, de las cuales el 57% es ocupada para la agricultura - principalmente para la siembra de caña de azúcar, maíz, arroz y piña-, mientras que el 40% es ocupado para la ganadería, y casi el 2% es usado para la actividad forestal al igual que lo urbano industrial. Es importante señalar que del total de la superficie el 21% está cubierto de agua de ríos y lagunas. Lo anterior refleja una importante riqueza natural y amplio abanico de alternativas productivas.

La Cuenca del Papaloapan contribuye con el 23% de la producción de azúcar para el estado y el 9% a nivel nacional, además de que alberga uno de los ingenios más importantes del país, San Cristóbal que aporta el 4.6% de azúcar para el país, 52% para el estado.

1.3.1. Producción agroindustrial en la región de la Cuenca del Papaloapan

La industria alimentaria produce grandes cantidades de residuos ricos en carbohidratos (residuos agroindustriales) que tienen un gran potencial en la producción de hidrógeno y que no han sido completamente estudiados (Van Ginkel *et al.*, 2005).

Muchos residuos agroindustriales de fácil disposición son potenciales alternativas de bajo costo en la producción de energías, como es el caso del bagazo de caña, bagazo de piña, cascarilla de arroz, entre otros. Algunos de los subproductos que se pueden obtener de este residuo agroindustrial son biocombustibles líquidos y gaseosos.

1.3.1.1. Producción de azúcar

A nivel nacional existen 59 ingenios, de los cuales el 37% se localizan en el estado de Veracruz. De esos 22 ingenios, en la Cuenca del Papaloapan existen 3 (tabla 6): El San Cristóbal, San Gabriel y Tres Valles (CNIAA, 2004).

El estado de Veracruz ocupa el 41% de la superficie nacional utilizada para la siembra de la caña. La región de la Cuenca del Papaloapan en comparación con la superficie estatal ocupa el 28% según la Cámara Nacional de la Industria Azucarera y Alcohólica (CNIAA, 2004).

La industria azucarera es la más importante generadora de empleos en la economía nacional, siendo la principal fuente de ingresos de al menos 13 mil personas, según SAGARPA en el 2006.

Tabla 6. Producción de azúcar en el estado de Veracruz en el 2006 (tomado de INEGI, 2005)

Municipio/Año	2006 (Ton)
Pánuco	1,118,100.00
Tres Valles	963,970.52
Cosamaloapan	921,568.12
Omealca	847,445.00
Actopan	756,949.75
Úrsulo Galván	747,232.00
Paso del Macho	677,429.00
Tierra Blanca	577,635.29
Tezonapa	615,250.00
El Higo	570,000.00
Otros	11,145,687.29
Total	18,941,266.97

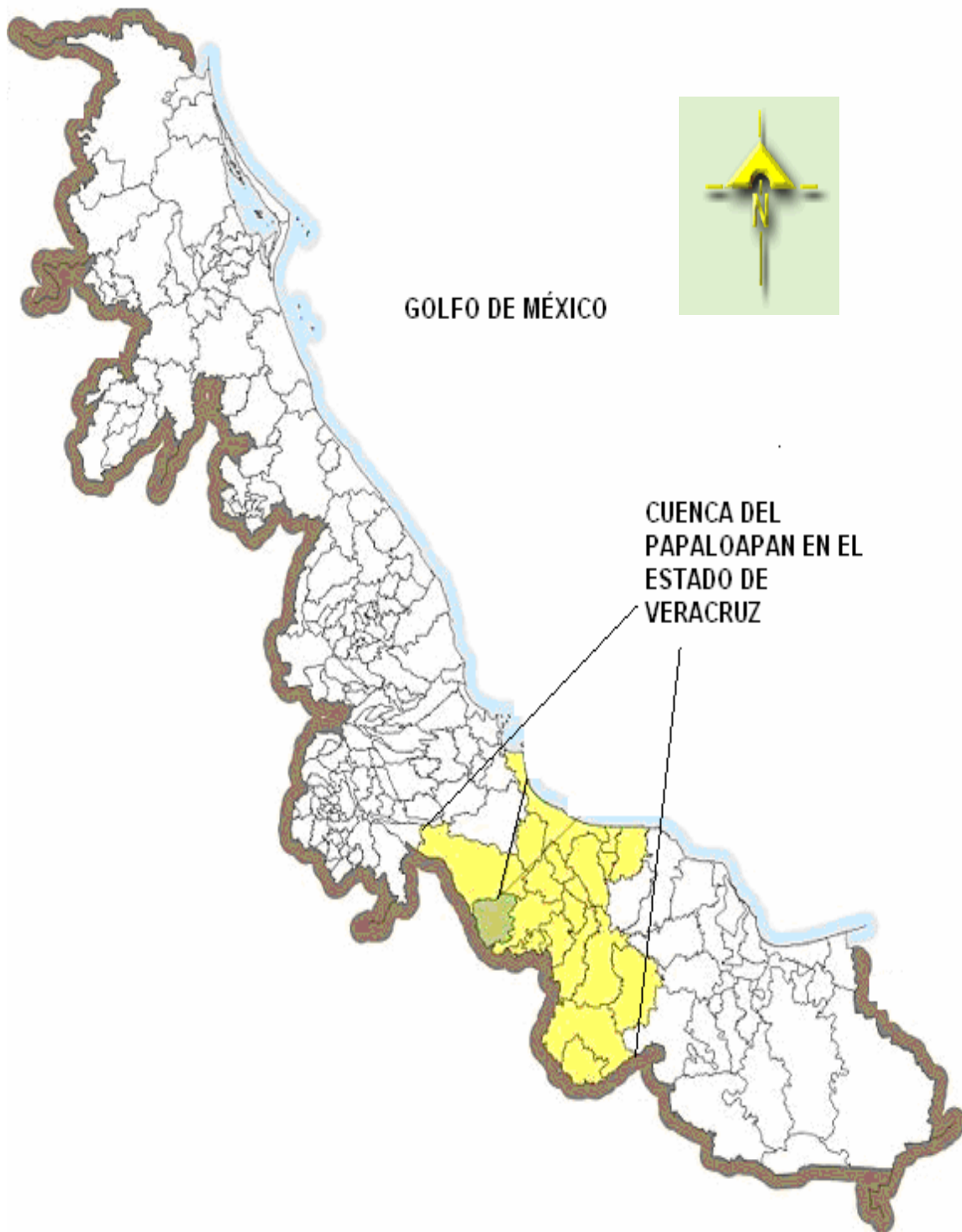


Figura 9. Estado de Veracruz, región de la Cuenca del Papaloapan.

García-Pérez *et al.* (2001), reportan que la fracción de bagazo de caña húmedo es el 22.5%, el rendimiento de caña por hectárea es de 70 toneladas por hectárea, generando 7.7 toneladas de azúcar por hectárea. De los municipios reportados en la tabla 6, los pertenecientes a la Cuenca del Papaloapan son Tres valles, Cosamaloapan y Tierra Blanca, los cuales reportaron una producción de azúcar de 2,463,173.64 toneladas, esa cantidad de azúcar proviene de 22,392,490 toneladas de caña de azúcar, con lo que se deduce que la cantidad generada de bagazo de caña en el 2006 fue de 5038310 toneladas.

1.3.1.2. Producción de piña

La piña es un fruto originario de América con una larga tradición en nuestro país y considerada en muchos países como una fruta exótica. En los últimos años esta fruta ha adquirido, en la región de la Cuenca del Papaloapan, una relevancia significativa por su dinámica económica y por ser una fuente importante de empleo, tanto en la producción y comercialización de la fruta fresca, como en el proceso de industrialización de las variedades de piña que se cultivan en el país (cayena lisa, criolla, esmeralda y roja española). En el Estado de Veracruz, la variedad principal es la cayena lisa, por lo que las estadísticas mencionadas a continuación se refieren a esa variedad. Los principales estados productores de piña cayena lisa son Veracruz, Oaxaca, Nayarit y Jalisco, de los cuales Veracruz ha ocupado el primer lugar en los últimos cinco años (SAGARPA, 2006). En el 2005 la producción fue de 356,473 toneladas (tabla 7) concentrada en la región de la Cuenca del Papaloapan (tabla 8).

J. Rodríguez Clara, Isla y José Azueta, son los tres municipios del estado de Veracruz pertenecientes a la cuenca del Papaloapan, tuvieron una producción de 321750 toneladas de piña en el 2006. El porcentaje de cáscara de piña en el fruto es de 27% por lo que en el mismo año se generaron 86872.5 toneladas de cascara de piña.

Tabla 7. Producción de piña cayena lisa en México (adaptado de SAGARPA, 2006)

Estados/Año	2001 (Ton)	2002 (Ton)	2003 (Ton)	2004 (Ton)	2005 (Ton)
Veracruz	320, 850.00	398, 317. 65	502, 540.25	501, 345.08	356,473.00
Oaxaca	0.00	0.00	96, 800.00	71, 240.00	87, 000.00
Nayarit	0.00	0.00	7, 650.00	9, 213.00	14, 340.80
Jalisco	0.00	0.00	0.00	0.00	1, 200.00
Otros	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Total	320, 850.00	398, 317. 65	606, 990.25	581, 798.08	459, 013.80

Tabla 8. Producción de piña cayena lisa en Veracruz (adaptado de SAGARPA, 2006)

Municipio/Año	2001 (Ton)	2002 (Ton)	2003 (Ton)	2004 (Ton)	2005 (Ton)
J. Rodríguez Clara	130, 550.00	140, 625.00	157,477.50	157,500.00	126,000.00
Isla	108, 000.00	117, 000.00	135,000.00	135,000.00	108,000.00
José Azueta	82, 350.00	85, 500.00	112,500.00	135,000.00	87,750.00
Medellín	0.00	33, 823.80	56,035.75	42,088.86	22,553.00
Tlaxicoyan	0.00	17, 955.20	31,712.64	24,941.68	10,000.00
Otros	0.00	3, 413.65	9,814.36	6,814.54	2,170.00
Total	320,850.00	398,317.65	502,540.25	501,345.08	356,473.00

1.3.1.3. Producción de arroz

El arroz es considerado como uno de los cereales de mayor consumo en el mundo siendo el sureste de Asia donde se produce y consume más. La cascarilla de arroz es un subproducto principal de la industrialización del arroz, posee bajo valor nutritivo, es de naturaleza abrasiva. Su cultivo es uno de los más importantes al practicarse en más de 100 países y a la vez es alimento básico de más de la mitad de la población mundial.

México no está exento de la producción del arroz, aunque ni siquiera figura entre los principales productores del mundo. Dentro de la producción nacional,

Veracruz y Campeche (SAGARPA, 2006) son los principales productores de arroz (tabla 9).

Tabla 9. Producción nacional de arroz en el 2000 y 2006 (adaptado de SAGARPA, 2006)

Estado/Año	2000 (Ton)	2006 (Ton)
Veracruz	100,246	50,099
Campeche	87,487	89,358
Michoacán	34,384	42,183
Tabasco	22,790	49,683
Nayarit	14,665	31,465
Otros	91,874	74,462
Total	351,446	337,250

Tres Valles es el principal productor de arroz en la entidad de Veracruz y de los primeros a nivel nacional (tabla 10), representando la siembra de arroz una de las actividades principales, sin dejar de ser una actividad minoritaria al proliferar la siembra de caña de azúcar en un porcentaje arrasador (SAGARPA, 2006).

Tabla 10. Producción de arroz en el estado de Veracruz en el 2000 y 2006 (adaptado de SAGARPA, 2006)

Municipio/Año	2000 (Ton)	2006 (Ton)
Tres Valles	42,269	17,100
Tierra Blanca	24,089	2,938
Tlaxiucoyan	14,318	9,964
Cosamaloapan	12,874	3,789
Actopan	2,523	2,841
Otros	34,173	13,467
Total	130,246	50,099

En los municipios de Tres Valles, Cosamaloapan y Tierra Blanca en el 2006 reportaron una producción de 23827 toneladas de arroz, considerando que el 20% corresponde a cascarilla, en ese año se generan 4765.4 toneladas de cascarilla en el 2006.

Los residuos agroindustriales antes mencionados por su rico contenido de celulosa y hemicelulosa son candidatos a ser usados para la generación de hidrógeno por vía fermentación oscura y fotofermentación en un sistema acoplado para mejorar el rendimiento del sustrato original, tal como se ha observado en los reportes hasta el momento. Se presenta un estimado de lo que podría obtenerse empleando dichos residuos, además de ser residuos que pueden entrar fácilmente en la estructura de biorefinerías. Cabe destacar un breve debate sobre cómo los resultados de esta investigación podrían afectar cuestiones de gestión de residuos agroindustriales. Como se sabe, el biohidrógeno es considerado como uno de los componentes más importantes en la biorefinerías modernas de residuos orgánicos que se basan en los principios de la cascada, la huella de carbono neutral y de no conflicto entre la energía y la alimentación (Fava *et al.*, 2012; Robledo-Narváez *et al.*, 2012). Por lo tanto, los resultados de biohidrógeno obtenidos en nuestro trabajo podría significar un gran avance en la gestión agrícola y agroindustrial de residuos sólidos, especialmente a nivel regional (Chandel *et al.*, 2012; Kautto y Peck, 2012; Vancov *et al.*, 2012).

La fermentación hidrógenogénica de la mezcla del bagazo de caña y residuos de piña estudiada en nuestro trabajo es importante para México (16 412 649 y 486 805 toneladas/año de bagazo y residuos de piña, respectivamente), así como otros países y regiones, como China (37 990 775, 325 787 toneladas/año), América del Sur (271 612 160, 814 959 toneladas/año), América Central (32 579 898, 746 736 toneladas/año) y Estados Unidos (8796 414, 370 007 toneladas/año) (DesktopDefault.aspx <http://faostat.fao.org/site/567/FAO?PageID=567#anchor>).

Por lo tanto los resultados de nuestra investigación podría llenar un vacío existente y serán útiles para la aplicación de métodos más eficaces para el tratamiento de residuos y la gestión en varias regiones de México y en el extranjero; en particular, la cuenca del Papaloapan, región agrícola al este de México, donde se generan más de 4,5 millones y 0,5 millones de toneladas/año de bagazo de caña de azúcar y piña, respectivamente (INEGI, 2005). Dado que los residuos agrícolas contienen típicamente 35-45% de celulosa y 20-30% hemicelulosa, se tienen cantidades anuales totales de 2.25 millones de toneladas de celulosa y 1.5 millones de toneladas de hemicelulosa en la región de la Cuenca del Papaloapan, que son sustratos atractivos para ser sometidos a fermentación oscura.

La Secretaría de Energía (2010) reporta que para el 2009 el requerimiento energético fue de 9250.7 PJ, de los cuales el 6.9% (638.3 PJ) se abasteció por energías renovables, a su vez la biomasa suplió el 3.8% de esa demanda energética, es decir 24.26 PJ.

Si consideramos la celulosa y hemicelulosa del bagazo de caña y residuos de piña podemos hacer un estimado del aporte energético que podría obtenerse empleando estos residuos, suponiendo que la celulosa y hemicelulosa (C+H) fueran glucosa podemos considerar un pseudorendimiento de hidrógeno de 1.5 molH₂/mol(C+H) y que 1 mol(C+H) es aproximadamente 0.18 Kg, así tendremos un factor de pseudorendimiento de 8.8 molH₂/Kg(C+H), además la entalpia de combustión del hidrógeno es de 143 KJ/g con estos datos podemos estimar que a nivel nacional el bagazo de caña mas el residuo de piña a través de un proceso fermentativo generarían 36.3 PJ, con esto se aumentaría el porcentaje de energía suplida a través de la biomasa de un 3.8 a un 5.7%, por otro lado este trabajo solo se enfoca a los residuos generado en la cuenca del Papaloapan, con esta consideración se tendría una producción de hidrógeno de 3.3X10¹⁰ molH₂/año equivalente a 8.052 PJ/año supliendo un tercio de la energía requerida a nivel nacional suplida a través de la biomasa.

Por lo tanto, la fermentación oscura de residuos agrícolas tal como se practica en nuestro trabajo podría ser la etapa principal de una biorrefinería que

genere biohidrógeno como un primer paso (Westermann *et al.*, 2007) y podría generar otros biocombustibles como metano, etanol, butanol, etc. (Escamilla-Alvarado *et al.*, 2012, Haagense *et al.*, 2005), así como productos biológicos de valor agregado tales como enzimas (Chandel *et al.*, 2012; Escamilla-Alvarado *et al.*, 2010b, Thygesen *et al.*, 2003), polifenoles (Robles-González *et al.*, 2012), ácidos grasos poli-insaturados (Andrade-Domínguez *et al.*, 2012) y polihidroxicanoatos (Scoma *et al.*, 2012), entre otros.

A pesar de las perspectivas prometedoras de la producción de hidrógeno empleando residuos agroindustriales existen varios factores y variables que plantean obstáculos a su aplicación y comercialización. Entre otras cosas, podemos clasificar las barreras en las siguientes categorías (Robledo-Narváez *et al.*, 2013):

(i). Obstáculos económicos, los subsidios a los combustibles fósiles, sobre todo, la falta de subvenciones y faltan de políticas claras y positivas para los biocombustibles en varios países; débil infraestructura de materiales reciclables (Myers y Kent, 2001; Dunn, 2002; Balat y Balat, 2009; Poggi-Varaldo, comunicación privada, 2012).

(ii). Las inversiones en infraestructura: H₂ necesita una nueva infraestructura (transporte y tuberías, una red de estaciones de carga de hidrógeno, seguridad, etc. (The economist, 2001).

(iii). Obstáculos técnicos, específicos de fermentación oscura:

(iii.1). Barreras Upstream relacionados: variación de sustrato (residuos orgánicos) en el tiempo y la disponibilidad, la segregación de residuos y acondicionamiento del sustrato (de Vrije y Claassen, 2003; Lo *et al.*, 2008, 2009, 2011; Urbaniec y Grabarczyk, 2009; Ntaikou *et al.*, 2010; Mostrar *et al.*, 2011).

(iii.2). Obstáculos relacionados con el proceso: mezclado, desviaciones adecuadas de fermentación, optimización inóculo, tiempos elevados de retención (que conduce a grandes biorreactores), materiales de construcción de reactores y equipos auxiliares, separación líquido/gas adecuado (Rivard *et al.*, 1989; Kataoka *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2006; Kotay y Das, 2008; Robledo-Narváez *et al.*, 2008;

Krupp y Widmann, 2009; Wang y Zhao, 2009; Das, 2009; Wang *et al.*, 2010; Escamilla-Alvarado *et al.*, 2012)

(iii.3). Barreras relacionadas al downstream: manejo del hidrógeno, purificación, almacenamiento y transporte, manejo de sólidos fermentado y después del tratamiento, etc (Amos, 1998; Padro y Putsche, 1999; EE.UU. DOE, 1999; Dunn, 2002; Teplyakov *et al.*, 2002; Belafi-Bako *et al.*, 2006; Modigell *et al.*, 2008).

(iv). Barreras sociales: Hay prejuicios injustos contra la percibida explosividad y peligros del H₂. La educación ambiental de las personas y de los consumidores sería una solución a estos prejuicios (Ball, 2001; Winter *et al.*, 2009).

2. Justificación

El uso de los combustibles fósiles provoca varios problemas como contaminación a cuerpos de agua, suelo y aire por su extracción, procesamiento y combustión, además de la dependencia económica e inestabilidad política y escasez en el suministro del combustible especialmente petróleo.

La búsqueda de fuentes alternas de energía es una necesidad apremiante a nivel mundial, el uso energético es primordial para un desarrollo económico, social y ambiental sostenido. Las opciones energéticas deben ser sustentables, es decir, conjugar la factibilidad económica y tecnológica y al mismo tiempo ser amigable con el ambiente.

Según los expertos, el hidrógeno es una de las alternativas idóneas, los procesos de producción pueden ser químicos, térmicos (estos métodos consumen energía fósil por lo que se considera que son procesos no amigables con el ambiente) y biológicos. Dentro de los procesos biológicos se encuentran los procesos fotosintéticos y la fermentación oscura. En los procesos fermentativos se emplean residuos ricos en materia orgánica (ej. residuos agroindustriales) como materia prima.

Por lo antes mencionado, se estudió la producción de hidrógeno empleando un proceso en dos etapas. En la primera etapa se evaluó la producción de hidrógeno a partir de fermentación oscura, empleando residuos agroindustriales (bagazo de caña y piña) provenientes de la Cuenca del Papaloapan. Estos residuos fueron inoculados con un consorcio microbiano anaerobio, se realizó una fermentación semicontinua a diferentes tiempos de retención másico en régimen mesofílico y termofílico, por otro lado, en una fermentación en lote se evaluó el efecto de la cantidad inicial de sólidos totales y pH inicial en la producción de hidrógeno. En la segunda etapa se evaluó la producción de hidrógeno por medio de fotofermentación, empleando como sustrato los extractos de los sólidos gastados de la primera etapa. El extracto de los sólidos gastados son ricos en ácidos orgánicos y solventes, se empleó un cultivo mixto fotoheterótrofo.

3. Hipótesis

3.1. Hipótesis general

Se podrá obtener producciones de biohidrógeno hasta 50% mayores en un proceso biológico en serie (fermentación oscura más fotofermentación hidrogenogénica) que con solamente fermentación oscura.

3.2. Hipótesis particulares

- 3.2.1. La producción de biohidrógeno es afectada negativamente al aumentar la cantidad de sólidos totales (ST) en la alimentación.
- 3.2.2. La productividad de biohidrógeno en digestión anaerobia de sustrato sólido acidogénico (DASSA) será mayor en régimen termofílico que en régimen mesofílico.
- 3.2.3. La hidrogenogénesis será inhibida a cortos tiempos de retención másico (TRM).
- 3.2.4. La DASSA termofílica tendrá un balance energético favorable.
- 3.2.5. La producción de biohidrógeno en fermentación anaerobia de sustrato sólido hidrogenogénico con venteo intermitente (FASSH-VI) será mayor a pH inicial $7.5 > 7.0 > 6.5$.
- 3.2.6. La producción de biohidrógeno en la fermentación de sustrato sólido (FSS) se afectará negativamente al aumentar la presión osmótica másica (debida a la cantidad de ST)
- 3.2.7. La producción de biohidrógeno en lote a pH ácido con cultivos fotoheterótrofos hidrogenogénicos (FHH) será al menos el 50% de la producción de biohidrógeno obtenido en FO.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Desarrollar y evaluar un proceso biológico con etapas en serie para maximizar la producción de biohidrógeno a partir de residuos obtenidos de las actividades agrícolas y agroindustriales de la zona de la cuenca del Papaloapan, *i.e.*, bagazo de caña y de piña.

4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Caracterizar los residuos agroindustriales y otras corrientes residuales, para así establecer una mezcla balanceada de desechos (atendiendo a relación C/N, pH, alcalinidad, etc.) que se alimentará al proceso biológico.
- 4.2.2. Evaluar correlaciones de la actividad de agua (a_w), capacidad de retención de agua (CRA) y conductividad eléctrica a diferentes contenido de ST de la alimentación en la producción de biohidrógeno
- 4.2.3. Evaluar el efecto del régimen térmico (mesofílico y termofílico) y del TRM sobre la producción de biohidrógeno en proceso DASSA.
- 4.2.4. Realizar balances energéticos de la FO (DASSA-mesofílico, DASSA-termofílico, FASSH-VI) con los cuales concluir: a) si algún eventual efecto benéfico DASSA-termofílico sobre la producción de biohidrógeno compensa los consumos adiciones de energía de la termofilia en comparación con la DASSA-M y b) si es redituable el proceso de DASSA-M y FASSH-VI a nivel energético
- 4.2.5. Evaluar el efecto del contenido de ST y pH en la alimentación sobre la producción de biohidrógeno en FASSH-VI
- 4.2.6. Caracterizar los extractos de sólidos gastados generados durante la digestión de la FORSA
- 4.2.7. Desarrollar cultivos fotoheterótrofos hidrogenogénicos a partir de inóculos naturales e implantar protocolos de preservación de los mismos.
- 4.2.8. Evaluar la producción adicional de biohidrógeno a partir de extractos de sólidos gastados de la FO con cultivos FHH en condiciones en lote estudiando el efecto del pH ácido sobre la inhibición de metano

5. Alcance

La propuesta se dividió en tres fases. En la primera fase se realizó la caracterización de los residuos sólidos agroindustriales, donde la actividad 1 consistió en la recolección y caracterización los residuos agroindustriales de los ingenios de la zona de la cuenca del Papaloapan y la empacadora de piña de los Naranjos, Veracruz.

En la segunda fase se llevo a cabo el manejo y operación de los digestores anaerobios de sustrato sólido metanogénico y acidogénico, la cual se dividió en actividad 2, en la cual se arrancaron y operaron los digestores anaerobios de sustrato sólido metanogénico (DASSM), en la actividad 3 se manejaron digestores anaerobios de sustrato sólido acidogénico (DASSA) en régimen mesofílico (actividad 3a) y en régimen termofílico (actividad 3b) y operación de minirreactores en FASSH-VI (actividad 3c). Por otro lado, en la actividad 4 se realizó el balance energético de DASSA-mesofílico y DASSA-termofílico.

En la fase tres se llevo a cabo la fotofermentación hidrogenogénica, donde se desarrollaron y preservaron cultivos fotoheterótrofos hidrogenogénicos (actividad 5) y por último la actividad 6 consistió en la operación en lote de los fotobiorreactores.

6. Metodología

6.1. Estrategia de trabajo

A continuación se presenta la estrategia de trabajo de este proyecto (figura 10).

Fase 1. Caracterización de los residuos sólidos agroindustriales

Actividad 1. Procuración y caracterización de los residuos agroindustriales

Fase 2. Manejo y operación de los digestores anaerobios de sustrato sólido metanogénico y acidogénico

Actividad 2. Arranque y operación de digestores anaerobios de sustrato sólido metanogénico (DASSM).

Actividad 3a. Manejo de digestores anaerobios de sustrato sólido acidogénico (DASSA) mesofílico.

Actividad 3b. Manejo de digestores anaerobios de sustrato sólido acidogénico (DASSA) termofílicos.

Actividad 3c. Operación de minirreactores en fermentación anaerobia hidrogenogénica en sustrato sólido con venteo intermitente (FASSH-VI).

Actividad 4. Desarrollo de balances energéticos de DASSA-mesofílico y DASSA-termofílico, y otros.

Fase 3. Manejo y operación de fotobiorreactores

Actividad 5. Desarrollo y preservación de cultivos fotoheterótrofos hidrogenogénicos

Actividad 6. Operación de los fotobiorreactores en sistema en lote.

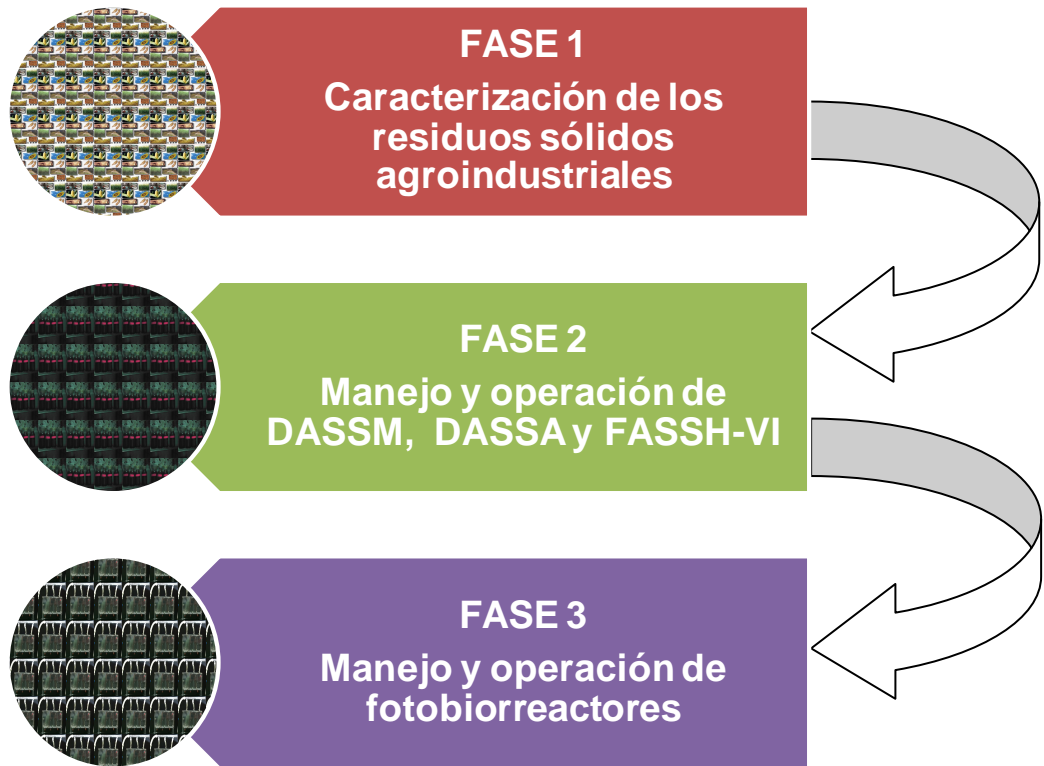


Figura 10. Estrategia de trabajo.

6.2. Diseño experimental y métodos

A continuación se muestran las actividades realizadas en cada fase, se presenta diseño experimental propuesto, así como los programas de seguimiento y análisis. También se reportan los métodos y los procedimientos.

6.2.1. Actividad 1. Procuración y caracterización de los residuos agroindustriales.

6.2.1.1. Propósito de la actividad 1

Esta actividad cumplió con el propósito de tener la cantidad suficiente de residuos agroindustriales para la realización de los experimento, la caracterización de los residuos agroindustriales tuvo la finalidad de diseñar la alimentación para los digestores anaerobios de sustrato sólido (DASS).

6.2.1.2. Programa de seguimiento y análisis de la actividad 1.

Los residuos utilizados fueron: Bagazo de caña y residuos de piña. El bagazo de caña se recolecto en los ingenios azucareros de Montzorongo y Tres Valles ubicados en la zona de la cuenca del Papaloapan. Los residuos de piña se recolectaron de la procesadora Los Naranjos ubicada en la comunidad con el mismo nombre.

El bagazo de caña se encontraba seco a la hora de su recolección por lo que se procedió a la molienda en un molino de martillo. Los residuos de la piña se secaron al sol y la reducción de tamaño también se realizó en un molino de martillo. Los residuos agroindustriales ya reducidos de tamaño se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Para llevar a cabo la caracterización de los residuos agroindustriales se plantearon las determinaciones que se muestran en la tabla 11, usando técnicas establecidas en el laboratorio 33 del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería (DBB) reportadas en el anexo D.

Una vez caracterizado los residuos agroindustriales se diseño la alimentación a los DASS, realizando un balance de materia para tener una

alimentación con diferentes cantidades de sólidos totales (ST) y cuatro diferentes cargas orgánicas en la fase de acidogénesis.

Tabla 11. Caracterización de residuos agroindustriales

Parámetro	Bagazo de caña	Residuos de piña
Ácidos orgánicos de bajo peso molecular	N/A	1/lote
Azúcares reductores	1/lote	1/lote
Celulosa	1/lote	1/lote
Humedad	1/lote	1/lote
Lignina	1/lote	1/lote
NKT	1/lote	1/lote
P total	1/lote	1/lote
pH	1/lote	1/lote
Proteína	1/lote	1/lote
Sólidos totales	1/lote	1/lote
Sólidos volátiles	1/lote	1/lote

También se determinó la actividad de agua (a_w), la capacidad de retención de agua (CRA) y conductividad eléctrica para evaluar un posible efecto sobre la producción de hidrógeno.

6.2.1.3. Métodos y procedimientos

La tabla 12 presenta el método en el cual se basa cada una de las determinaciones realizadas, así como la referencia para cada método. El procedimiento de las determinaciones se presenta a detalle en los anexos.

Tabla 12. Método para cada determinación a realizar de los residuos agroindustriales

Parámetro	Método
Ácidos orgánicos de bajo peso molecular	Poggi-Varaldo y Rinderknecht, 1990
Azúcares reductores	Miller, 1959
Celulosa	Poggi-Varaldo y Rinderknecht, 1990
Humedad	AOAC. 14003. 1984
Lignina	Poggi-Varaldo y Rinderknecht, 1990
NKT	APHA-WPCF-AWWA, 1985
P total	APHA-WPCF-AWWA, 1985
pH	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> , 2005, Poggi-Varaldo y Oleszkiewicz 1992
ST	Standard Methods 1981
SV	Standard Methods 1981
Sólidos totales, volátiles	Poggi-Varaldo, 1996

6.2.1.3.1. Actividad de agua (a_w)

El agua es esencial para los microorganismos, la mayoría de los nutrientes requeridos deben estar en forma soluble para que los tomen del medio, el grado de disponibilidad de agua puede expresarse como la a_w , la cual es definida como la presión de vapor de la sustancia o solución entre la presión de vapor de agua destilada (Atlas y Bartha, 2006).

Se acondicionó la FORSA a 15, 18, 20, 25, 32 y 35% de sólidos totales y se determinó la a_w de cada mezcla con un termohigrometro Thermoconstanter Humidat RTD-3/TH-2 (Novosina, Zurich, Switzerland) de acuerdo a las especificaciones del manual, este equipo da la lectura de la humedad relativa valor que se divide entre 100 y obtenemos el valor de la a_w .

6.2.1.3.2. Capacidad de retención de agua (CRA).

La CRA es un parámetro físico-químico importante, esta relacionado generalmente con la textura del material objeto de estudio. Los cambios en la CRA afecta al agua que se denomina inmovilizada y no tiene relación con el agua de constitución (Gupta y Larson, 1979).

El agua más fácil de extraer es el agua extracelular y es la que origina la llamada pérdida por goteo, mediciones de esta agua liberada son usadas como indicador de las propiedades para ligar agua del material de estudio. Este parámetro puede ser usado como un estimador de la disponibilidad de agua para plantas y microorganismos.

Se pesa una cantidad conocida de la FORSA y se coloca en un papel filtro previamente pesado y colocado en un embudo, se adiciona agua hasta su completa absorción saturando la FORSA de agua y se deja escurrir por 24h, se tapan con papel aluminio para evitar perdida de agua por evaporación. Se pesa el papel filtro con la muestra pasadas las 24h, el valor de la CRA para nuestro trabajo se obtuvo de la siguiente manera (en anexo E4 se detalla 3 maneras de calcular la CRA, ecuación 10):

$$CRA = \frac{(W_{mh} - tara - W_s)}{W_s} * 100; \left(\frac{g_{agua}}{100g_{sustrato\ seco}} \right) \quad [10]$$

donde:

W_{mh} = Peso muestra húmeda a saturación

W_s = Peso de la muestra seca

6.2.1.3.3. Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica, se define como la capacidad que tienen las sales inorgánicas en solución (electrolitos) para conducir la corriente eléctrica. El agua pura, prácticamente no conduce la corriente eléctrica, sin embargo el agua con sales disueltas si lo hace. Los iones cargados positiva y negativamente son los que conducen la corriente, y la cantidad conducida dependerá del número de

iones presentes y de su movilidad. En la mayoría de las soluciones acuosas, entre mayor sea la cantidad de sales disueltas, mayor será la conductividad, es decir, permite el paso de partículas cargadas, bien sean los electrones, los transportadores de carga en conductores metálicos o semimetálicos, o iones, los que transportan la carga en disoluciones de electrolitos (Chang y Goldsby, 2013).

Esta actividad tuvo la finalidad de determinar si la FORSA proporciona iones al medio y por consecuencia aumenta la presión osmótica adicional a la presión osmótica mátrica. Además se determinó la conductividad de la FORSA acondicionada a las diferentes cantidades de sólidos totales para ver si la adición de la solución amortiguadora proporciona un aumento en la conductividad.

6.2.2. Actividad 2. Arranque y operación de digestores anaerobios de sustrato sólido metanogénico (DASSM).

6.2.2.1. Propósito de la actividad 2.

La finalidad de operar DASSM es contar con un número suficiente de unidades experimentales que para ser convertidos en digestores anaerobios de sustrato sólido acidogénico (DASSA) al termino de la actividad.

6.2.2.2. Diseño experimental de la actividad 2.

El diseño experimental constó de 3 etapas (figura 11). En la primera etapa se arrancaron y aclimataron digestores con un inóculo que consta de 1/3 de excreta de vaca, 1/3 de suelo cribado y 1/3 de lodos activados, el cual nombramos inóculo "3/3"; se operaron hasta tener una composición estable de metano en el biogás (de preferencia aproximadamente 60% de CH₄); posteriormente en la segunda etapa se inició la alimentación con FORSA con un TRM de 35d, la composición de CH₄ en el biogás debe mantenerse estable (≈60%). Por último, en la tercera etapa se realizó una sobrecarga orgánica para favorecer la hidrogenogénesis.

En la tabla 13 se muestran las variables de respuesta correspondientes a la actividad 2.

La remoción de SV, η_{sv} (%) para DASSM (semicontinuo y continuo) en estado estable, se determina con la ecuación 11.

$$\eta_{sv} (\%) = \left(\frac{\sum m_i (SV)_i - \sum m_f (SV)_f}{\sum m_i (SV)_i} \right) * 100 \quad [11]$$

donde:

$\sum m_i (SV)_i$ = masa alimentada en gSV

$\sum m_f (SV)_f$ = masa purgada en gSV

Tabla 13. Variables de respuesta de la actividad 2.

Parámetro	Alimentación	Biogás	Purga	Método
Producción de biogás (NmLbg/Kg/d)	NA	2/sem	NA	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> 2005
Qbg (NmLbg/d)	NA	2/sem	NA	Oleszkiewicz y Poggi-Varaldo, 1997; Poggi-Varaldo y Oleszkiewicz, 1992
CH ₄ (%)	NA	2/sem	NA	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> 2005; Poggi-Varaldo, 1996
Producción de CH ₄ (NmLCH ₄ /Kg/d)	NA	2/sem	NA	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> 2005
QCH ₄ (NmLCH ₄ /d)	NA	2/sem	NA	Oleszkiewicz y Poggi-Varaldo, 1997; Poggi-Varaldo y Oleszkiewicz, 1992
ST (%)	1/lote	NA	2/sem	Oleszkiewicz y Poggi-Varaldo, 1997; Poggi-Varaldo y Oleszkiewicz, 1992
SV (%)	1/lote	NA	2/sem	Oleszkiewicz y Poggi-Varaldo, 1997; Poggi-Varaldo y Oleszkiewicz, 1992
Eficiencia de remoción de SV, η_{sv} (%)	NA	NA	2/sem	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> 2005; Poggi-Varaldo, 1996
α	NA	NA	2/sem	Ripley <i>et al.</i> 1986
pH	2/sem	NA	2/sem	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> , 2005, Poggi-Varaldo y Oleszkiewicz 1992
Concentración de ácidos orgánicos	1/lote	NA	2/sem	Poggi-Varaldo y Rinderknecht, 1990
Concentración de solventes	1/lote	NA	2/sem	Poggi-Varaldo y Rinderknecht, 1990

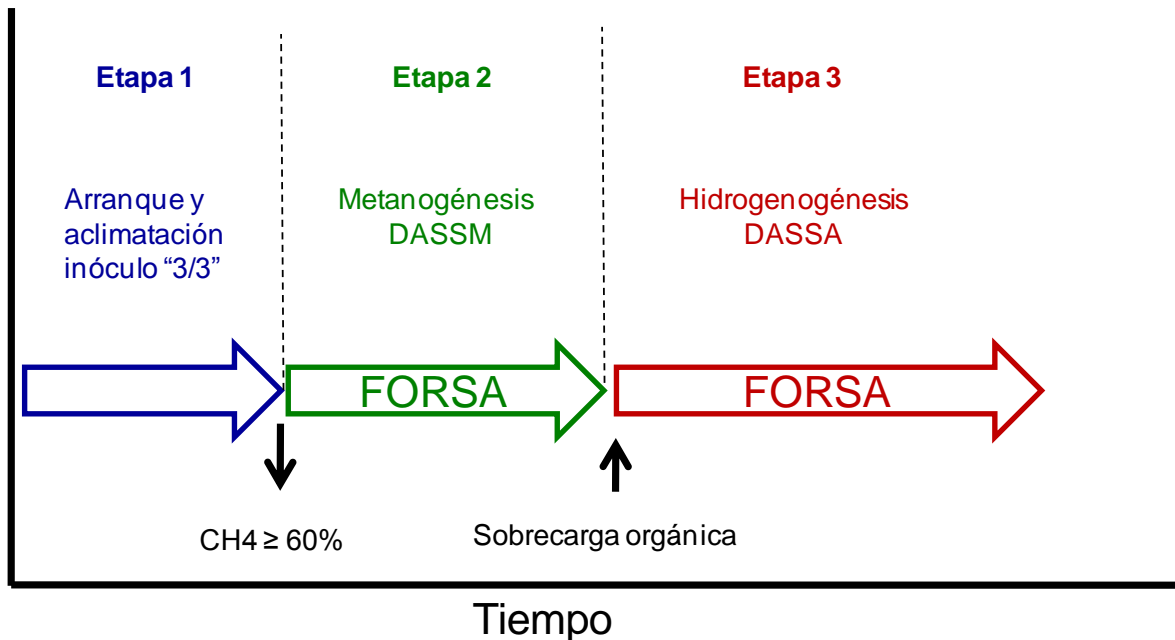


Figura 11. Diseño experimental de la actividad 2.

6.2.2.3 Programa de seguimiento y análisis de la actividad 2.

Se arrancaron y operaron digestores anaerobios de sustrato sólido metanogénico (DASSM), los digestores fueron frascos de vidrio de 1.0 L de volumen, se adicionó una masa neta húmeda de 500 g de inóculo "3/3". Se cerraron con tapones de hule número 13 a los cuales se les hizo una salida para la medición del biogás. La salida para medición del biogás consta de una manguera tygon no. 18 conectada a una botella serológica Pyrex de volumen de 60 mL, adaptada con dos salidas, una proveniente del digestor y una que va al medidor de biogás. De la botella serológica Pyrex con dos salidas se toman muestra del biogás con una jeringa cromatográfica para determinar la composición del biogás producido en el DASSM. La producción del biogás se midió por desplazamiento volumétrico de salmuera. Por otro lado, para asegurar un ambiente anaerobio los DASSM se gasearon con nitrógeno por 3 minutos. Se ajustó alcalinidad con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y se adiciona 2 g de sacarosa/Kg. La adición de sacarosa se hizo

de acuerdo al desempeño de los DASSM hasta que la producción de metano en la mezcla gaseosa fue aproximadamente del 60%. Los DASSM fueron incubados a 35 y 55°C. Una vez estable la composición de CH₄ en el biogás, los DASSM se alimentaron con FORSA a 35% de ST en base húmeda, operados a TRM de 35d poco más de un mes, durante el tiempo de operación se mantuvo la metanogénesis. Los DASSM se incubaron en regímenes mesofílico (35°C) y termofílico (55°C). La FORSA empleada en este experimento tuvo 96.2% de ST y 92.0% de SV en base ST.

Los parámetros de seguimiento y análisis se muestran a continuación en la tabla 14.

6.2.2.4. Métodos y procedimientos de la actividad 2.

El volumen de biogás en cada DASSM se midió por desplazamiento volumétrico de salmuera y se reportan como promedio diario. La composición de biogás se determina por cromatografía de gases en un cromatógrafo con detector de conductividad térmica GOW-MAC modelo 350 equipado con una columna empacada Molecular Sieve 5A. Las condiciones fueron las siguientes: inyector a 25 °C, detector a 100 °C y columna a 25 °C, se utilizó argón como gas acarreador. Por otro lado, se hizo un seguimiento del pH, colocando 1 parte de sólidos gastados con 5 partes de agua destilada. El pH debe estar cercano a la neutralidad, cuando se llegaron a acidificar se intervinieron con sosa concentrada.

Tabla 14. Parámetros de seguimiento y análisis de los digestores anaerobios de sustrato sólido metanogénico

Parámetro	Alimentación	Purga	Biogás
Producción de biogás (NmLbg/Kg/d)	NA	NA	2/sem
Qbg (NmLbg/d)	NA	NA	2/sem
CH ₄ (%)	NA	NA	2/sem
Producción de CH ₄ (NmLCH ₄ /Kg/d)	NA	NA	2/sem
QCH ₄ (NmLCH ₄ /d)	NA	NA	2/sem
ST (%)	1/lote	2/sem	NA
SV (%)	2/sem	2/sem	NA
Eficiencia de remoción de SV, η_{sv} (%)	2/sem	2/sem	NA
α	2/sem	2/sem	NA
pH	2/sem	2/sem	NA

6.2.3. Actividad 3. Manejo de digestores anaerobios de sustrato sólido acidogénico (DASSA) mesofílico y termofílico.

6.2.3.1. Propósito de la actividad 3.

En esta etapa los DASSM se convirtieron y se manejaron como DASSA, con la finalidad de evaluar el efecto del TRM sobre la producción de H₂. Esta actividad se dividió en dos partes en régimen mesofílico y régimen termofílico.

6.2.3.2. Diseño experimental de la actividad 3.

Se realizó una búsqueda bibliográfica donde se encontró un intervalo de cargas orgánicas que va aproximadamente de 3 a 56 g SV/L/d (tabla 15), las cargas orgánicas propuestas se consideraron dentro del intervalo dado.

Tabla 15. Intervalo de cargas utilizadas en otros trabajos con fermentación sumergida de residuos

S_o^a (gSV/L)	θ^b (d)	V^c (L)	Q^d (L/d)	B_v^e (g SV/L/d)	Temp (°C)	Ref.
17.84	6.00	3.00	0.500	2.97	60	1
17.84	4.00	3.00	0.750	4.46	60	1
17.84	3.00	3.00	1.000	5.95	60	1
4.10	0.50	0.50	1.000	8.20	35	2
17.84	2.00	3.00	1.500	8.92	60	1
17.84	1.00	3.00	3.000	17.84	60	1
6.20	0.25	0.50	2.000	24.80	35	2
17.84	0.70	3.00	4.290	25.48	60	1
17.84	0.50	3.00	6.000	35.67	60	1
23.70	0.50	0.50	1.000	47.40	60	3
66.60	1.20	110	91.67	55.50	60	4

Nota: ¹ Ueno *et al.*, 2006, ² Antonopoulou *et al.*, 2008, ³ Ueno *et al.*, 2007a, ⁴ Ueno *et al.*, 2007b. ^a S_o : concentración de sólidos volátiles en la alimentación, ^b θ : tiempo de retención hidráulico, ^c V : volumen de operación; ^d Q : carga hidráulica, ^e B_v : carga orgánica volumétrica.

Por otro lado, Valdez-Vázquez *et al.* (2005b), emplearon una alimentación con 35% de ST y 21% de SV, con un TRM de 21d y una carga orgánica de 11gSV/Kg/d. Siendo Valdez-Vázquez el antecedente directo de este trabajo, se propuso trabajar con una alimentación con 35% de ST, 92% de SV (base ST) y con una carga orgánica de 15, 25, 35 y 45 gSV/Kg/d, se determinaron los TRM para esas cargas orgánicas y el diseño experimental fue un factorial 2X4 (tabla 16) dando 8 unidades experimentales (UE), las corridas se hicieron por duplicado, por lo que se manejaron un total de 16 DASSA.

Tabla 16. Diseño factorial de la actividad 3.

Temperatura (°C)	TRM (d)			
	7	10	13	22
35				
55				

Donde el primer factor fue la temperatura con dos niveles, 35 y 55 °C, y el segundo factor fue el TRM a cuatro niveles, 7, 10, 13 y 22 d. Las variables de respuesta se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Variables de respuesta de la actividad 3

Parámetro	Alimentación	Biogás	Purga	Método
Producción de biogás (NmL _{bg} /Kg/d)	NA	2/sem	NA	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> 2005
Q _{bg} (NmL _{bg} /d)	NA	2/sem	NA	Oleszkiewicz y Poggi-Varaldo, 1997; Poggi-Varaldo y Oleszkiewicz, 1992
CH ₄ (%)	NA	2/sem	NA	Oleszkiewicz y Poggi-Varaldo, 1997; Poggi-Varaldo y Oleszkiewicz, 1992
Producción de CH ₄ (NmL _{CH4} /Kg/d)	NA	2/Sem	NA	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> 2005; Poggi-Varaldo, 1996
Q _{CH4} (NmL _{CH4} /d)	NA	2/Sem	NA	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> 2005; Poggi-Varaldo, 1996
H ₂ (%)	NA	2/sem	NA	Oleszkiewicz y Poggi-Varaldo, 1997; Poggi-Varaldo y Oleszkiewicz, 1992
Producción de H ₂ (NmL _{H2} /Kg/d)	NA	2/Sem	NA	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> 2005; Poggi-Varaldo, 1996
Q _{H2} (NmL _{H2} /d)	NA	2/Sem	NA	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> 2005; Poggi-Varaldo, 1996
ST (%)	1/lote	NA	2/sem	Oleszkiewicz y Poggi-Varaldo, 1997; Poggi-Varaldo y Oleszkiewicz, 1992
SV (%)	1/lote	NA	2/sem	Oleszkiewicz y Poggi-Varaldo, 1997; Poggi-Varaldo y Oleszkiewicz, 1992
Eficiencia de remoción de SV, $\eta_{sv}(\%)$	NA	NA	2/sem	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> 2005; Poggi-Varaldo, 1996
pH	2/sem	NA	2/sem	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> , 2005, Poggi-Varaldo y Oleszkiewicz 1992
Concentración de ácidos orgánicos	1/lote	NA	2/sem	Poggi-Varaldo y Rinderknecht, 1990
Concentración de solventes	1/lote	NA	2/sem	Poggi-Varaldo y Rinderknecht, 1990

6.2.3.3 Actividad 3a. Manejo de digestores anaerobios de sustrato sólido acidogénico (DASSA) mesofílico.

6.2.3.3.1. Programa de seguimiento y análisis de la actividad 3a y b.

La FORSA se acondicionó a 35% de ST, el contenido de humedad del sustrato se ajustó con soluciones amortiguadoras de fosfatos. Se controló el pH en un intervalo de 5.5 a 6.0, el pH fue intervenido con sosa concentrada. Se evaluaron diferentes TRM, haciendo una corrida con 4 UE, por duplicado dando 8 UE totales. Se midió la producción de H₂ y CH₄, metabolitos como ácido acético, propiónico, butírico, láctico, acetona, etanol, metanol y butanol. Los tiempos de retención másico a evaluar fueron 22, 13, 10 y 7 días a sus respectivas cargas, 15, 25, 35 y 45 gSV/Kg/d. Los DASSA provienen de los DASSM incubados a 35°C, los cuales se incubaron a la misma temperatura. Los parámetros de seguimiento y análisis se muestran en la tabla 18.

6.2.3.3.2. Métodos y procedimientos de las actividades 3a y b.

La producción de biogás se determinó diariamente por desplazamiento de salmuera. Los volúmenes de biogás se reportaron como promedio diario en cada ciclo de alimentación. La composición de biogás se determinó por cromatografía de gases en un cromatógrafo con detector de conductividad térmica GOW-MAC modelo 350 equipado con una columna empacada Molecular Sieve 5A.

Las condiciones serán las siguientes: inyector a 25 °C, detector a 100 °C y columna a 25°C, se utilizó argón como gas acarreador. La determinación de solventes y ácidos orgánicos se realizó en un cromatógrafo con detector de ionización de flama Varian Star 3400. La temperatura del inyector y detector fueron de 250 °C. Como gas acarreador se utilizó nitrógeno a 2.6 mL/min. La temperatura de la columna se programó de la siguiente manera: 60°C por 5 minutos, incremento de 12°C/min hasta 200°C, por último temperatura constante a 200°C por 5 minutos.

Se utilizó una columna capilar FFAP (0.25 mm de diámetro interno y 30 m de largo). Los sólidos totales, sólidos volátiles, NKT, lignina y celulosa en la

alimentación y sólidos gastados se determinaron como se reporta en el anexo D; el pH se medio mezclando 1 parte de sólidos gastados y 5 partes de agua destilada a 4°C (Valdez-Vázquez *et al.*, 2005; Poggi-Varaldo y Oleszkiewicz, 1992).

Tabla 18. Parámetros de seguimiento y análisis de la actividad 3a y b.

Parámetro	Alimentación	Purga	Biogás	Método
ST (%)	2/Sem	2/sem	NA	Poggi-Varaldo, 1996, 1999
SV (%)	2/Sem	2/Sem	NA	Poggi-Varaldo, 1996, 1999
pH	2/Sem	2/Sem	NA	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> , 2005; Poggi-Varaldo y Oleszkiewicz 1992
Ácidos orgánicos	1/lote	2/sem	NA	Poggi-Varaldo y Rinderknecht, 1990
Solventes	1/lote	2/sem	NA	
H ₂ (%)	NA	NA	2/Sem	CG (Valdez-Vázquez <i>et al.</i> , 2005)
CH ₄ (%)	NA	NA	2/Sem	CG (Valdez-Vázquez <i>et al.</i> , 2005)
Producción de biogás (NmL _{bg} /Kg/d)	NA	NA	2/Sem	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> , 2005
Q _{bg} (NmL _{bg} /d)	NA	NA	2/Sem	Oleszkiewicz y Poggi-Varaldo, 1997; Poggi-Varaldo y Oleszkiewicz, 1992
Producción de CH ₄ (NmL _{CH4} /Kg/d)	NA	NA	2/sem	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> , 2005; Poggi-Varaldo, 1996
Q _{CH4} (NmL _{CH4} /d)	NA	NA	2/sem	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> , 2005; Poggi-Varaldo, 1996
Producción de H ₂ (NmL _{H2} /Kg/d)	NA	NA	2/sem	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> , 2005; Poggi-Varaldo, 1996
Q _{H2} (NmL _{H2} /d)	NA	NA	2/sem	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> , 2005; Poggi-Varaldo, 1996
Eficiencia de remoción de SV, η_{sv} (%)	NA	2/Sem	NA	Valdez-Vázquez <i>et al.</i> , 2005; Poggi-Varaldo, 1996

6.2.3.4. Actividad 3b. Manejo de digestores anaerobios de sustrato sólido acidogénico (DASSA) termofílico.

Para los DASSA en régimen termofílico se realizó el mismo procedimiento descrito en la sección 6.2.3.3 incubándose a 55°C. Los DASSA termofílicos fueron DASSM termofílico que fueron oportunamente sobrecargados con alimentación.

6.2.3.5. Actividad 3c. Manejo de minirreactores en fermentación anaerobia de sustrato sólido hidrogenogénica con venteo intermitente (FASSH-VI).

6.2.3.5.1. Propósito de la actividad 3c.

El propósito de esta actividad fue evaluar el efecto del contenido de ST del sustrato y del pH inicial sobre la producción de hidrógeno.

6.2.3.5.2. Diseño experimental de la actividad 3c.

El diseño experimental es un factorial 2^2 con puntos centrales (Myers y Montgomery, 2007) como se muestra en la tabla 19.

El sustrato que se empleó fue la FORSA, una mezcla en base húmeda de bagazo de caña (70%), residuos de piña (15%) y lodos activados (15%). Las unidades experimentales se incubaron a 35°C, se empleó un inóculo metanogénico proveniente de los DASSM. Se operaron unidades experimentales control de inóculo, donde solo se añadió inóculo sin sustrato. Por otro lado, se tuvieron unidades experimentales control abiótico, donde se añadió sustrato e inóculo y posteriormente se tindalizaron. A todas las unidades experimentales (activas y control) se les adicionó 5% (del volumen gaseoso) de acetileno (C_2H_2) como inhibidor de la metanogénesis.

Tabla 19. Diseño de puntos centrales para las variables de contenido inicial de sólidos totales iniciales y pH inicial, cantidad FORSA acondicionada y de inóculo en cada unidad experimental y composición de la FORSA acondicionada

T ^a	ST _i ^b (%)	pH _i ^c	m _i ^d FA (gbh)	m _i ^e inóculo (gbh)	FA ^f (base: 100g)	
					FORSA ^g (g)	Sol. Amortiguadora ^h (mL)
1	18	6.65	32	8	20.90	79.10 ⁱ
2	32	6.65	32	8	38.95	61.05 ⁱ
3	18	7.35	32	8	20.70	79.30 ^j
4	32	7.35	32	8	38.40	61.60 ^j
5	15	7.00	32	8	17.00	83.00 ^k
6	35	7.00	32	8	42.24	57.76 ^k
7	25	6.50	32	8	29.73	70.27 ^l
8	25	7.50	32	8	29.46	70.54 ^m
9	25	7.00	32	8	29.63	70.37 ⁿ
10	25	7.00	32	8	29.63	70.37 ⁿ
11	25	7.00	32	8	29.63	70.37 ⁿ
12	25	7.00	32	8	29.63	70.37 ⁿ
13	25	7.00	32	8	29.63	70.37 ⁿ

Nota: ^aTratamiento, ^bSólidos totales iniciales, ^cpH inicial, ^dmasa inicial de FA, ^fFA: FORSA acondicionada (FORSA + sol. Amortiguadora), ^gFORSA: Fracción orgánica de residuos sólidos agroindustriales, ^hSol. Amortiguadora de fosfatos (tabla 22), ⁱsolución 2 (tabla 22), ^jsolución 4 (tabla 22), ^ksolución 3 (tabla 22), ^lsolución 1 (tabla 22), ^msolución 5 (tabla 22), ⁿsolución 3 (tabla 22).

Cada una de las unidades experimentales tuvo réplica, las variables de respuesta se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Variables de respuesta del diseño experimental de puntos centrales

Parámetro	Alimentación	Biogás	Purga
Producción acumulada de hidrógeno (mmolH ₂ /reactor)	NA	2/sem	NA
Producción de CH ₄ (mmolCH ₄ /reactor)	NA	2/sem	NA
Concentración de ácidos orgánicos (mgDQO/gSV)	1/lote	NA	1/lote
Concentración de solventes (mgDQO/gSV)	1/lote	NA	1/lote
Relación A/B (mgDQOHAc/mgDQOHBu)	NA	NA	1/lote
Relación $\Sigma AV/\Sigma sol$ (mg DQOAV/mgDQOsol)	NA	NA	1/lote

6.2.3.5.3. Programa de seguimiento y análisis de la actividad 3c.

En la tabla 21 se muestra los parámetros de seguimiento y análisis de esta actividad.

Tabla 21. Parámetros de seguimiento y análisis de la actividad 3c.

Parámetro	Inóculo	Alimentación	Purga	Biogás
Sólidos totales	Inicial	Inicial	Final	NA
Sólidos volátiles	Inicial	Inicial	Final	NA
pH	Inicial	Inicial	Final	NA
Ácidos orgánicos	NA	Inicial	Final	NA
Solventes	NA	Inicial	Final	NA
H ₂ (mmol/reactor)	NA	NA	NA	Diario
CH ₄ (mmol/reactor)	NA	NA	NA	Diario

6.2.3.5.4. Métodos y procedimientos de la actividad 3c.

6.2.3.5.4.1. Procedimiento de inoculación de los FASSH-VI

Se prepararon soluciones amortiguadoras de fosfato a diferentes pH para ajustar el pH inicial en cada unidad experimental. En la tabla 22 se presenta las diferentes composiciones de las soluciones amortiguadoras a emplear.

El sustrato es acondicionado con solución amortiguadora a los diferentes contenidos de ST iniciales y los diferentes pH iniciales (tabla 19).

Los minirreactores son botellas con capacidad de 230 mL, en las cuales se adiciono 32g de FA y 8g de inóculo, teniendo un total de 40g en cada botella.

Tabla 22. Soluciones amortiguadoras de fosfatos a diferentes pH

Solución	pH	KH₂PO₄ (g/L)	K₂HPO₄ (g/L)
1	5.7	12.75	1.13
2	6.0	11.94	2.14
3	6.5	9.32	5.50
4	7.0	5.31	10.63
5	7.5	2.18	14.63

La FA e inóculo se mezclaron manualmente, se taparon con un tapón de hule del número 7, se colocó un arnés metálico. Todas las unidades experimentales se gasearon con N₂ para garantizar una atmósfera anaerobia (con sello hidráulico). El gaseo con N₂ se realizó por dos minutos, se adicionó 5% del espacio gaseoso de C₂H₂ y se incubaron a 35°C, como se muestra en la figura 12.

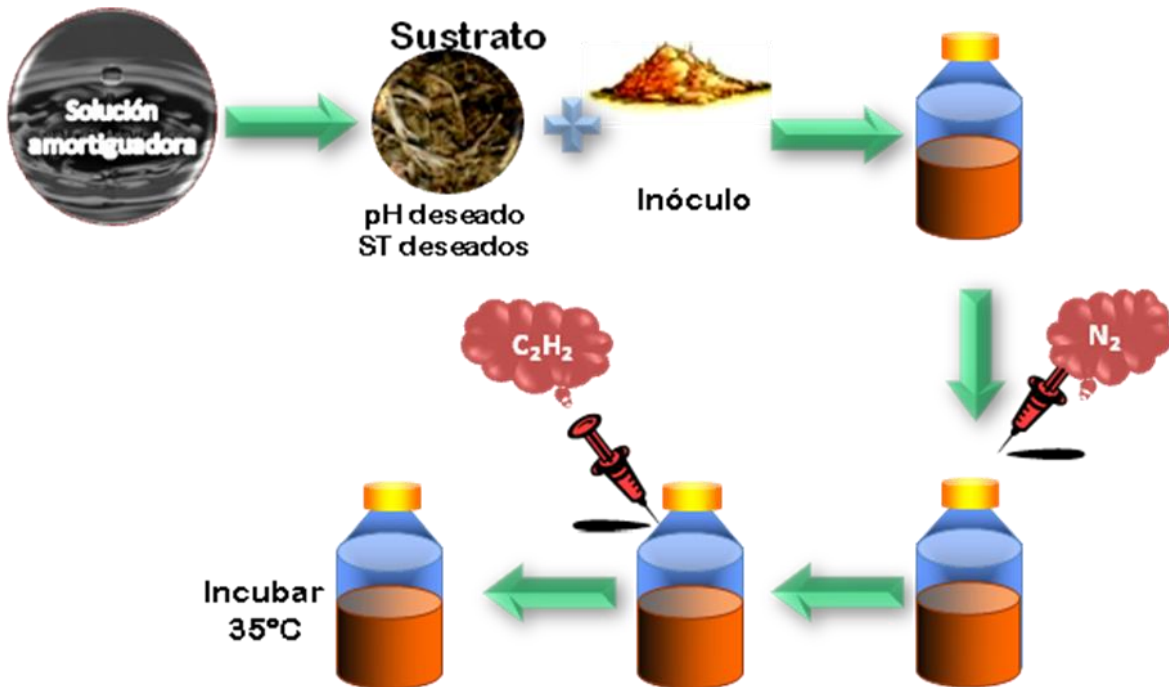


Figura 12. Procedimiento de inoculación de los FASSH-VI

6.2.3.5.4.2. Procedimiento del venteo y gaseo con N_2 de la FASSH-VI

Las unidades experimentales se monitorearon diariamente, se determinó la composición del biogás empleando cromatografía de gases. Se monitorearon antes y después del venteo. El venteo se realizó con sello hidráulico. Una vez que se obtiene una producción máxima de hidrógeno se gasea con N_2 , con la finalidad de “lavar” el espacio gaseoso de los FASSH-VI e iniciar un nuevo ciclo de producción (figura 13). No se adicionó más sustrato o inóculo.

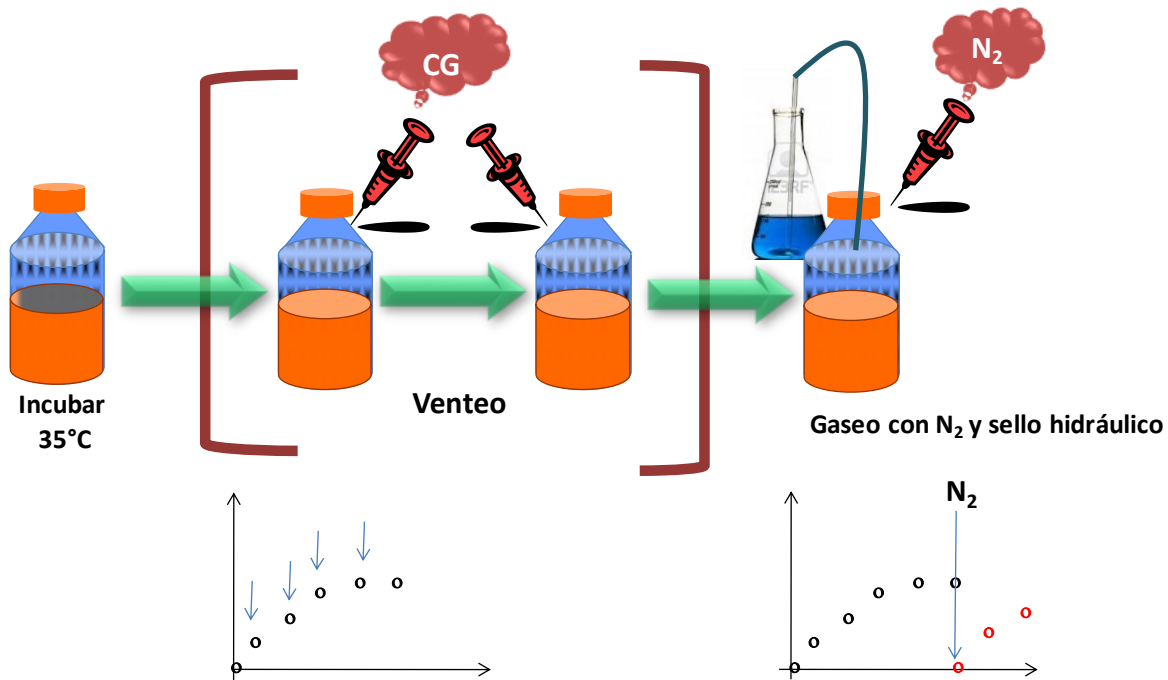


Figura 13. Procedimiento de venteo y gaseo de los FASSH-VI

6.2.3.5.4.3. Procedimiento de obtención del extracto de la FORSA y la FA usada en la FASSH-VI

Al iniciar al experimento se tiene la FORSA la cual se acondicionó con solución amortiguadora de fosfatos para obtener la cantidad de ST inicial y los pH iniciales requeridos en cada UE. A cada una de las mezclas se les hizo un extracto para determinar la conductividad eléctrica, parámetro que nos indica si el aporte de sales del sustrato ofrece presión osmótica al medio además de la presión osmótica mátrica que aporta la cantidad de ST inicial.

Se tomó una cantidad conocida de la FORSA y de la FA y se adicionó agua en una relación 1:3, se agitó vigorosamente con la ayuda del vortex y se centrifugó a 10000 rpm/5 minutos, se recuperó el sobrenadante, que es el extracto.

6.2.4. Actividad 4. Balance energético de DASSA-mesofílico (DASSA-M), DASSA-termofílico (DASSA-T), y otros.

6.2.4.1. Propósito de la actividad 4.

En esta etapa se realizaron los balances energéticos, para comparar el consumo de energía requerido para la producción de hidrógeno y la energía aprovechable que se obtiene de la combustión del H₂; para comprobar si es redituable el proceso a nivel energético.

6.2.4.2. Métodos y procedimientos de la actividad 4.

Se realizó un balance de energía neta de DASSA-M, DASSA-T y FASSH-VI utilizando los métodos de cálculo usuales de la energía química y bioquímica. La energía que entra a un proceso con los materiales alimentados más la energía neta que se añade al proceso, es igual a la energía de salida de los materiales. Expresando esto de forma matemática (Geankoplis, 1998),

$$\sum H_R + (-\Delta H_{298}^\circ) + q = \sum H_P \quad [12]$$

donde $\sum H_R$ es la suma de las entalpías de todos los materiales que entran al proceso con respecto al estado de referencia (para el calor normal de reacción) a 298 K y 101.32 KPa (25°C y 1 atm). $\sum H_P$ es la suma de las entalpías de los productos mesofílico y termofílico. $(-\Delta H_{298}^\circ)$ es el calor normal de reacción a 298K y 101.32 KPa. q es el calor transferido al sistema y w (trabajo) no se muestra en la ecuación 12 por que en muchos casos de ingeniería de proceso, que casi siempre se llevan a cabo a presión constante, la energía eléctrica, la energía potencial y el trabajo, no están presentes o resultan despreciables. De esta manera, sólo es necesario tomar en cuenta la entalpía de los materiales (a presión constante), la energía normal de la reacción química, y el calor añadido o extraído (Geankoplis, 1998; Felder y Rousseau, 1981).

Los DASSA en régimen mesofílico se incubaron en un cuarto a temperatura controlada de $36 \pm 1^\circ\text{C}$, esta temperatura se mantiene con el uso de una

resistencia. Se calcula el gasto energético en KW de la resistencia y se comparo con la energía que aporta el H₂ producido (Cálculos teóricos). Lo mismo procede para los DASSA en régimen termofílico, estos digestores se incubaron en una cámara de madera 55°C, usando resistencias eléctricas. En la figura 14 se muestra el diagrama de flujo del proceso de producción de hidrógeno en DASSA.

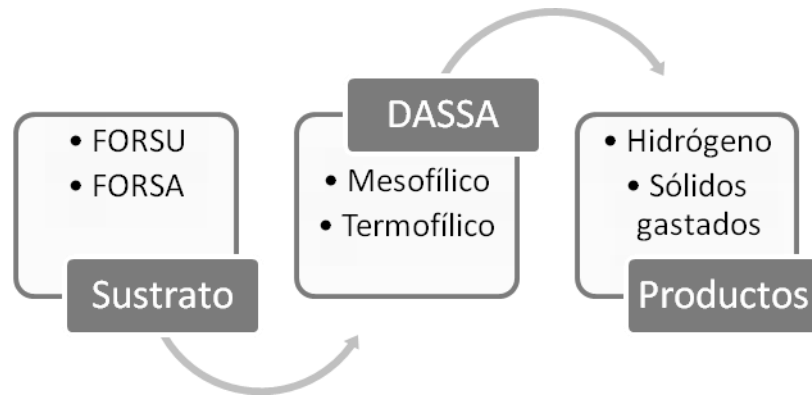


Figura 14. Producción de hidrógeno usando digestores anaerobios de sustrato sólido acidogénico

Para comprobar la superioridad de la hidrogenogénesis termofílica sobre el proceso mesofílico se utiliza la ecuación 13. Los excedentes netos de producción de hidrógeno (termofília vs mesofília) y sus correspondientes valores energéticos se compararon con las pérdidas por calefacción y las pérdidas de energía al ambiente tomando en cuenta el volumen de hidrógeno producido, el flujo másico alimentado a los DASSA, el área de transferencia (A) de calor de los DASSA y la conductividad térmica (k) de fibra de vidrio como aislante.

$$\left[m_{H_2,T} - m_{H_2,M} \right] \Delta \hat{H}_{comb} \geq 0 \text{ or } \leq (55 - 35)^\circ C \left[\dot{m}_a C_p + \frac{kA}{e} \right] \quad [13]$$

Donde:

$m_{H_2,T}$ = producción de hidrógeno en régimen termofílico

$m_{H_2,M}$ = producción de hidrógeno en régimen mesofílico

$\Delta \hat{H}_{comb}$ = gradiente de entalpía

\dot{m}_a = Flujo másico de alimentación

C_p = capacidad calorífica de la alimentación

k = conductividad térmica del aislante

A = área de transferencia térmica del reactor

e = espesor del aislante

El incremento energético de hidrógeno está representado por el extremo izquierdo de la ecuación 13, mientras que las pérdidas por calentamiento se encuentran en el correspondiente extremo derecho. Éstas pueden ser calculadas de manera independiente mediante la ecuación 14.

$$NetQ_{heating} = (55 - 35)^\circ C \left[\dot{m}_a C_p + \frac{kA}{e} \right] \quad [14a]$$

Para el proceso FASSH-VI, se desea comprobar si el proceso es redituable energéticamente. Se calculó la energía requerida en el proceso, empleando la ecuación:

$$E_{requerida} \cong \Delta H_{\substack{\text{calentamiento} \\ \text{FORSA} \\ T_{amb} \rightarrow T_r}} + \Delta H_{\substack{\text{calentamiento} \\ \text{reactor} \\ T_{amb} \rightarrow T_r}} + Q_{\substack{\text{calefacción} \\ \text{para mantener} \\ \text{a } T_r}} + E_{mezclado} \quad [14b]$$

los resultados obtenidos se compara con la energía aportada por el hidrógeno producido en la FASSH-VI, dicha energía se calcula con la ecuación:

$$E_{H_2} = P_{H_2} \left(\frac{mmol}{g_{SS}} \right) * m_{FORSA} (g_{SS}) * \left(\frac{ST(\%)}{100} \right) * \frac{1 mol}{1000 mmol} * \Delta H_{c,H_2} \left(\frac{J}{mol} \right) \quad [14c]$$

Se compararon los resultados y se evaluó si existió la superioridad de la hidrogenogénesis (detalles y desarrollo en el anexo F8).

6.2.5. Actividad 5. Desarrollo y preservación de cultivos fotoheterótrofos hidrogenogénicos

6.2.5.1. Propósito de la actividad 5.

Desarrollar cultivos fotoheterótrofos hidrogenogénico a partir de inóculos naturales (o nativos) aislados lagunas del estado de Veracruz, además de desarrollar e implementar protocolos de preservación de cultivos fotoheterótrofos hidrogenogénicos, que pueda ser utilizado en la actividad 6.

6.2.5.2. Programa de seguimiento y análisis de la actividad 5.

Los microorganismos utilizados en los reactores fotoheterótrofos se seleccionaron de las lagunas El Coyol (19°10'05.13"N, 96°09'19.86"O), Lagartos (19°12'12.38"N, 96°10'38.02"O), Floresta (19°10'35.62"N, 96°09'25.74"O) ubicadas en el municipio de Veracruz y el lago de Puente Moreno (19°4'0"N, 96°9'0"O) ubicado en el municipio Medellín de Bravo, ambos municipios del estado de Veracruz.

Se montó una columna Winogradsky (Schlegel, 1997; Madigan *et al.*, 2002; Acevedo-Benítez, 2009) de donde se seleccionaron BPNA. Las BPNS seleccionadas se incubaron con una fuente de luz artificial a una intensidad de luz de 3 Klx empleando una lámpara de tungsteno de 100 W. Cuando se diferenció una sección de color rojo y púrpura fue indicativo de que las BPNA se habían desarrollando.

Posteriormente, se tomó una muestra de la sección de color rojo y púrpura de la columna Winogradsky y se inocularon las botellas serológicas con medio Pfennig (Acevedo-Benitez, 2009; Montiel-Corona, 2010) para favorecer el desarrollo las BPNA y realizar el enriquecimiento de las mismas. El enriquecimiento consiste en hacer resiembras. Cada resiembra se hizo cuando se presentaba coloración roja, marrón o púrpura en las botellas serológicas. Posteriormente, se alimentaron las botellas serológicas con medio Pfennig con un TRH de 21d. La alimentación se realizó semanalmente monitoreando la producción de H₂, cuando se observaba una disminución de la producción de H₂

se alimentaban nuevamente; cuando después de la alimentación no se observaba un aumento en la producción de H_2 se sembraban nuevamente. Las botellas serológicas se incubaron con una fuente de luz artificial empleando una lámpara de tungsteno de 100W a una intensidad de luz de 3 Klx a $30\pm 2^\circ C$.

6.2.5.3. Métodos y procedimientos

La columna de Winogradsky es una demostración clásica de cómo los microorganismos ocupan "microespacios" altamente específicos de acuerdo con sus tolerancias medioambientales y sus necesidades vitales (requerimientos de carbono y energía) y que, además, ilustra cómo diferentes microorganismos desarrollan sus ciclos, y la interdependencia que llega a existir entre ellos (las actividades de un microorganismo permite crecer a otro y viceversa). Esta columna es un sistema completo y autónomo de reciclamiento, mantenido sólo por la energía de la luz. Se montó la columna Winogradsky, usando fango recolectado del lago de Puente Moreno en Medellín de Bravo, Veracruz y se puso a sedimentar. Posteriormente se tomaron 600 mL de fango, se adicionó 30 g de aserrín, recolectado de los talleres del CINVESTAV, a esta mezcla se le adicionó 15 g de $CaSO_4$, 15 g de $CaCO_3$ y 3 g de sacarosa. Se llenó la columna hasta $3/4$ de su volumen y se eliminaron las burbujas de aire, se colocó agua del fango aproximadamente 10 cm arriba de la mezcla. La columna se tapó con papel aluminio. Se incubó con iluminación continua a 3Klx. Durante los 3 días siguientes se eliminaron las burbujas de aire y se dejó bajo iluminación continua a temperatura ambiente por 15 días.

El dispositivo constó de un cilindro ancho de vidrio que se llena con fango recolectado mezclado con aserrín. Se añade a la mezcla $CaSO_4$ y $CaCO_3$ (que actúan como fuente de sulfato y amortiguador respectivamente) y sacarosa. En la mezcla no deben quedar burbujas de aire, se cubre con agua procedente del lago de donde se tomó el fango. La mezcla debe ser espesa con textura cremosa, se cubre con papel de aluminio y se coloca bajo una fuente luminosa cuidando que no se caliente la columna. Se incubó aproximadamente un mes, las lámparas utilizadas fueron de tungsteno de 100W y lámparas de halógeno.

Se tomó una muestra de la columna Winogradsky de la parte coloreada rojo o púrpura (figura 15) y se inoculó en las botellas serológicas que fueron incubadas de 2-3 semanas a 30°C con una fuente luminosa; cuando las botellas se tornaron de un color púrpura brillante, rojo o marrón se iniciaron las resiembras inoculando al 10%. Posteriormente se usaron como inóculo para la fotofermentación.

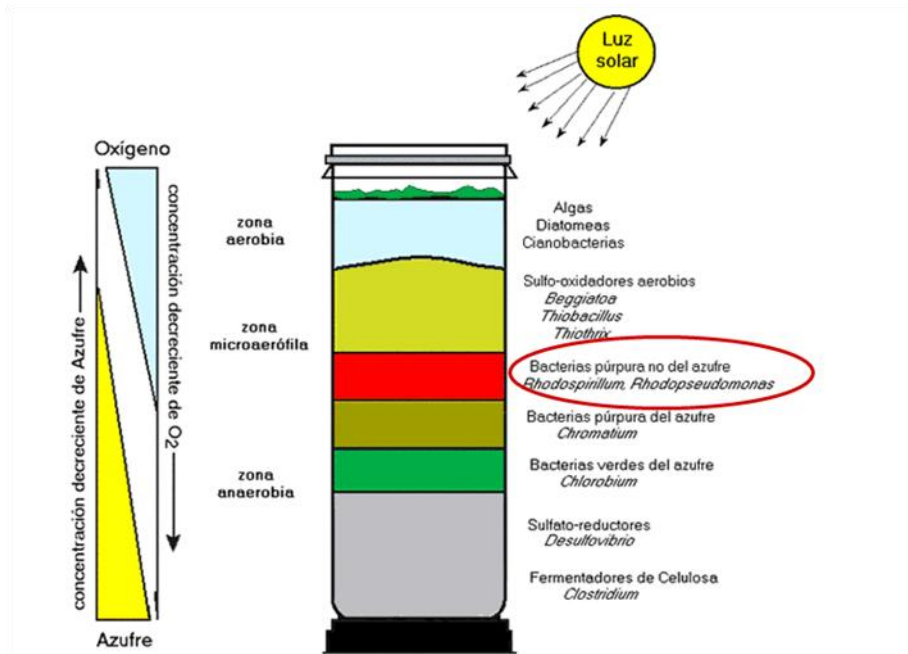


Figura 15. Ilustración de la estratificación en una columna Winogradsky (tomado de Madigan *et al.*, 2002).

6.2.6. Actividad 6. Operación de fotobiorreactor en sistema en lote

6.2.6.1. Propósito de la actividad 6.

El propósito de esta actividad es operar fotobiorreactores usando consorcios de BPNA para producción de hidrógeno, empleando como sustrato extractos de sólidos gastados de DASSA ricos en ácidos orgánicos y solventes.

6.2.6.2. Diseño experimental de la actividad 6.

El diseño experimental consistió en emplear dos tipos de microorganismos, iluminación continua, se usaron lámpara de tungsteno, la iluminación fue de 3klux (Fascetti *et al.*, 1995 y 1998; Chun-Ye *et al.*, 2007; Acevedo-Benítez, 2009; Montiel-Corona, 2010), su pH fue ácido para evitar la metanogénesis. Las UE se alimentaron con extractos de los sólidos gastados de DASSA, a dichos extractos se les determino concentración de ácidos orgánicos (ácido acético, propiónico, butírico, láctico) y solventes (acetona, etanol, metanol y butanol), el extracto no se esteriliza. Se evaluó la composición de CH₄ (%) y de H₂ (%) en el biogás producido, la producción acumulada de H₂, remoción de ácidos orgánicos, $\eta_{ac. org.}$ (%), remoción de solventes, $\eta_{sol.}$ (%), remoción de DQO, η_{DQO} (%), eficiencia de producción de hidrógeno, $\eta_{H_2/sustrato}$, eficiencia de conversión de luz, $\eta_{H_2/luz}$.

La remoción de ácidos orgánicos se calcula con la ecuación 15.

$$\eta_{ac.org.} = \left(\frac{[ác.org.]_i - [ác.org.]_f}{[ác.org.]_i} \right) * 100 \quad [15]$$

donde

$\eta_{ac.org.}$ = remoción de ácidos orgánicos

[ác. org]_i = concentración de ácidos orgánicos en la alimentación (mgDQO/L si se hace el balance con la suma de todas las especies o mg_i/L cuando se hace el balance por cada especie)

[ác. org]_f= concentración de ácidos orgánicos en la purga (mgDQO/L si se hace el balance con la suma de todas las especies o mg/L cuando se hace el balance por cada especie)

La remoción de solventes se calcula con la ecuación 16.

$$\eta_{sol.} = \left(\frac{[sol.]_i - [sol.]_f}{[sol.]_i} \right) * 100 \quad [16]$$

donde

η_{sol} = remoción de solventes

[sol]_i= concentración solventes en la alimentación (mgDQO/L si se hace el balance con la suma de todas las especies o mg/L cuando se hace el balance por cada especie)

[sol]_f= concentración de solventes en la purga (mgDQO/L si se hace el balance con la suma de todas las especies o mg/L cuando se hace el balance por cada especie)

La remoción de DQO se calcula con la ecuación 17.

$$\eta_{DQO} = \frac{[DQO]_i - [DQO]_f}{[DQO]_i} * 100 \quad [17]$$

donde:

DQO_i = concentración inicial de DQO en gDQO/L

DQO_f = concentración final de DQO en gDQO/L

La eficiencia de conversión del sustrato, $\eta_{H_2/sustrato}$, se calcula de la siguiente manera (Boran *et al*, 2010; Koku *et al.*, 2002; detalles en anexo F5):

$$\eta_{H_2/sustrato} = \left(\frac{H_2 \text{ cosechado}}{\text{máx } H_2 \text{ esperado}} \right) * 100 \quad [18]$$

donde:

H_2 cosechado = hidrógeno producido (mmol/L)

máx H_2 esperado = hidrógeno esperado si todo el sustrato (cada especie presenten la mezcla del extracto) fuera convertido 100% a hidrógeno.

La eficiencia de conversión de luz se calcula con la ecuación 19 (Lata *et al.*, 2007, memoria de cálculo de cada coeficiente en anexo F6).

$$\eta_{H_2/luz} = \frac{H_{2,cosechado}(mmolH_2) * \Delta H_{c,H_2} \left(\frac{J}{mmol} \right)}{I \left(\frac{W}{m^2} \right) * A(m^2) * t(s)} * 100 \quad [19]$$

donde:

I= densidad luminosa (W/m^2)

A = área irradiada ($0.045 m^2$)

t= tiempo de producción de H_2 (s)

6.2.6.3. Programa de seguimiento y análisis de la actividad 6.

Se realizó el extracto de los sólidos gastados de los DASSA que fue empleado como sustrato en los fotobiorreactores; los fotobiorreactores tienen un volumen total fue de 2.25 L, con un volumen de operación de 2 L, se mantuvo la temperatura a $30 \pm 2^\circ C$, se gasearon con argón para garantizar condiciones anaerobias. Se midió a cada UE la producción de hidrógeno, la producción de metano, remoción de ácidos orgánicos, solventes, DQO, la eficiencia de conversión de sustrato y de luz, así como el pH.

Los parámetros de seguimiento y análisis se presentan a continuación:

- pH al inicio y al final del proceso
- Concentración de ácidos orgánicos al inicio y al final del proceso
- Concentración de solventes al inicio y al final del proceso
- Producción de biogás y composición de H_2 y CH_4 en el mismo (%).
- Producción de H_2 (NL/d) y composición en el biogás (%)
- Producción de CH_4 (NL/d) y composición en el biogás (%)

6.2.6.4. Métodos y procedimientos para la actividad 6.

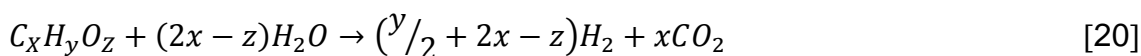
La composición del biogás se determinó 2 veces por semana por cromatografía de gases, las características del cromatógrafo a usar se detallan en la sección 6.2.2.4.

Para determinar ácidos orgánicos y solventes en los sólidos gastados, se tomaron 5g de sólidos gastados, provenientes de los DASSA, los cuales se mezclaron con 25 mL de agua destilada. La suspensión se centrifugó por 5 min a 10000 rpm, se tomó una alícuota que se inyectó a un cromatógrafo de gases Varian Star 3400 equipado con un detector de ionización de flama (FID) para determinar la concentración de metabolitos. La temperatura para el inyector y el detector se fijó a 250°C.

En esta actividad además se diseñó, se mandó a construir y se arrancó un fotobiorreactor que puede utilizarse para producción de biohidrógeno con cultivos fotoheterótrofos hidrogenogénicos en proceso en lote. El fotobiorreactor es rectangular y cerrado, con una base de 30 cm, una altura de 15 cm y un ancho de 5 cm, con un volumen total de 2.25L y un volumen de operación de 2L. En la figura 16 se muestra el esquema del fotobiorreactor (Takabatake *et al.*, 2004; Zabut *et al.* 2006).

El sustrato fue los extractos de los sólidos gastados provenientes de DASSA. La concentración de sustrato es la que se obtuvo de los extractos, se hizo una dilución 1:10, el pH fue ácido para evitar la metanogénesis, empleando iluminación continua a 3 Klx.

La eficiencia de producción de hidrógeno se calcula con la ecuación 18 antes mencionada, para calcular el hidrógeno máximo esperado se debe conocer la relación de moles teóricos de hidrógeno producido por cada tipo de sustrato alimentado, se puede obtener con la siguiente reacción general (modificada de Koku *et al.*, 2002, ejemplos en anexo F7):



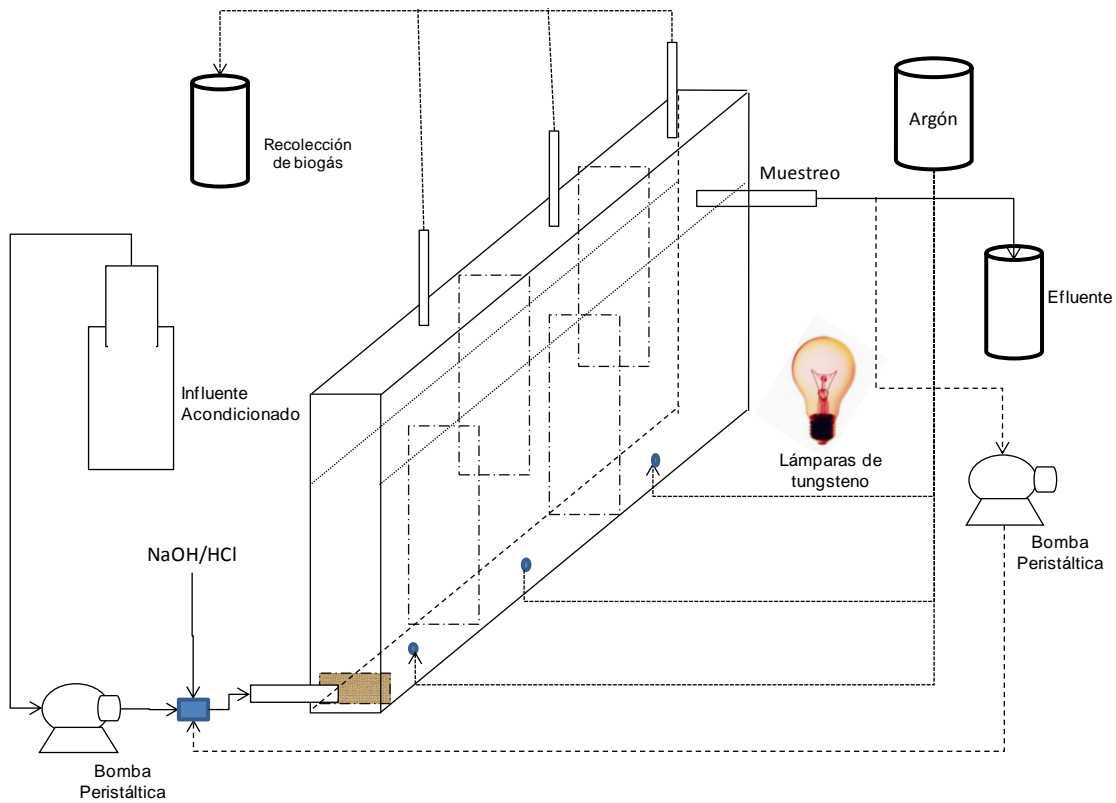


Figura 16. Esquema del fotobiorreactor

Por otro lado, en la tabla 23 se enlistan los parámetros de seguimiento y análisis.

Tabla 23. Programa de seguimiento y análisis de la actividad 6

Parámetro	Medio		Biogás
pH	Inicio	Final	NA
[ácidos orgánicos]	Inicio	Final	NA
[solventes]	Inicio	Final	NA
DQO (g/L)	Inicio	Final	NA
H ₂ (mmol/L)	NA	NA	Cada ciclo
CH ₄ (mmol/L)	NA	NA	Cada ciclo
H ₂ (%)	NA	NA	Cada ciclo
CH ₄ (%)	NA	NA	Cada ciclo

7. Resultados y discusión

A continuación se presentan los resultados obtenidos en cada actividad y la discusión de los mismos.

7.1. Resultados y discusión de la actividad 1. Procuración y caracterización de los residuos agroindustriales.

Se recolectó el bagazo de caña del ingenio azucarero Montzorongo y Tres Valles, los residuos de piña los proporcionó la empacadora Los Naranjos, por otro lado, los lodos activados provienen de la Planta de Tratamiento de San Juan Ixhuatepec (Av. La presa, Tlanepantla, Estado de México).

El bagazo de caña y los residuos de piña se secaron al sol, el bagazo de caña no requirió disminución de tamaño, los residuos de piña se disminuyeron de tamaño con un molino de martillos (figura 17), ambos residuos agroindustriales se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

Se realizó la caracterización de los residuos agroindustriales de manera individual, en la tabla 24 se muestran los resultados de la caracterización del bagazo de caña, los residuos de piña y de cascarilla de arroz; se decidió no usar la cascarilla de arroz en la mezcla de alimentación. Los resultados de lignina, celulosa, NKT y proteína se compararon con literatura como se observa en las tablas 25, 26, 27 y 28, los resultados están en el orden de lo reportado en literatura por Área *et al.*, 2002; Fernández, 2004; Gutiérrez, *et al.*, 2003; Valverde *et al.*, 2004; con esto se asegura que las técnicas empleadas en el L-33 del DBB son adecuadas para la caracterización del tipo de sustrato que utilizamos, ya que es la primera vez que en el grupo de trabajo se emplean residuos agroindustriales. Solo se modificó la técnica de ST porque esta no resultó adecuada por la naturaleza de la composición del sustrato, dicha modificación se refleja en la técnica reportada en el anexo E.

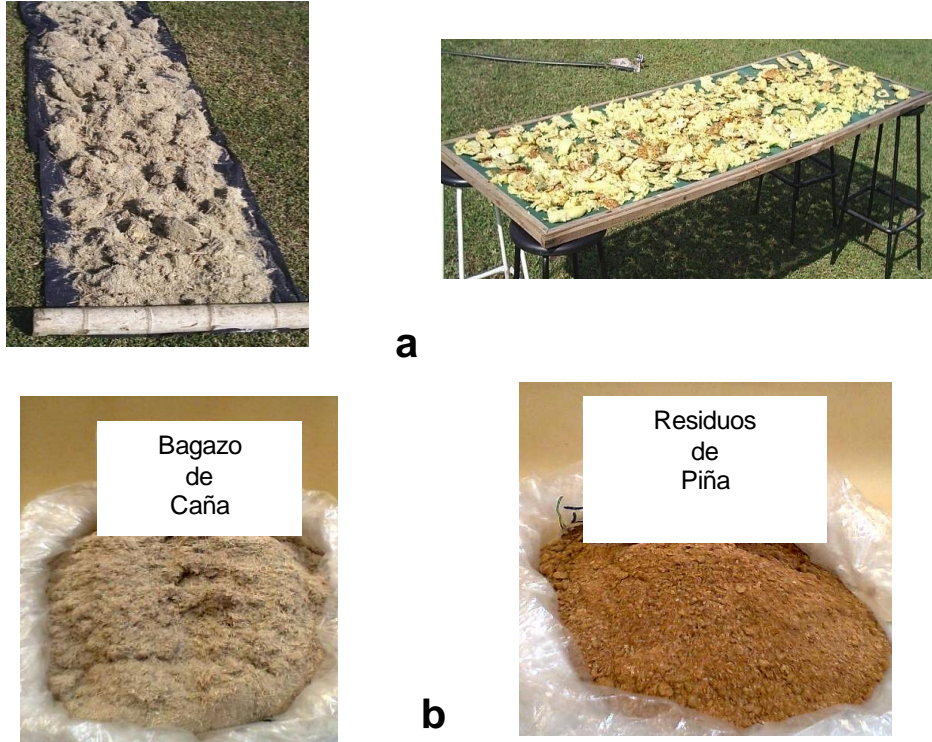


Figura 17. Residuos agroindustriales: (a) bagazo de caña y residuos de piña tal como se recolectan, (b) bagazo de caña y residuos de piña como se almacenan.

Por otro lado, una de las premisas es hacer un manejo de los residuos sólidos, se decidió que la FORSA tuviera mayor cantidad de bagazo de caña al ser el residuo de mayor generación en la zona de la Cuenca del Papaloapan, la adición de los lodos activados fue con la finalidad de aportar nitrógeno a la mezcla, por lo tanto la FORSA es una mezcla de bagazo de caña, residuos de piña y lodos activados en una proporción del 70, 15 y 15% respectivamente en base húmeda, en la tabla 29 se muestra la caracterización de la FORSA.

Tabla 24. Caracterización de residuos agroindustriales

Parámetro	Bagazo de caña	Residuos de piña	Cascarilla de arroz
Celulosa (%)	43.98±1.58	30.98±0.30	57.32±0.13
Humedad (%)	8.91±0.56	15.65±1.24	9.72±0.25
Lignina (%)	19.77±1.70	1.41±0.12	19.05±5.90
P total (mg/g en base seca)	9.01±2.08	4.81±1.70	6.13±0.21
Sólidos totales (% en base húmeda)	91.09±0.56	84.35±1.24	90.28±0.25
Sólidos volátiles (% en base seca)	96.38±0.42	96.33±0.15	82.55±0.03
Azúcares reductores (mgGlu/g en base húmeda)	0.86±0.18	7.43±0.37	0.0046±0.0015
NKT (%)	0.13±0.01	0.43±0.05	0.17±0.01
Proteína (%)	0.78±0.04	2.68±0.30	1.08±0.05
pH	4.59±0.26	4.14±0.03	6.73±0.01
Ac. Acético (mg/g en base húmeda)	NA	0.0042	NA
Ac. Propiónico		0.0038	
Ac. Butírico		0.0009	

Tabla 25. Comparación de resultados de lignina con valor reportado en literatura

Lignina			
Residuo	Este trabajo		Referencia
Bagazo de caña	19.77±1.70	22.06	Área <i>et al.</i> , 2002
Cascarilla de arroz	19.05±5.90	22.80	Fernández, 2004
Residuos de piña	1.41± 0.12	1.95	Gutiérrez, <i>et al.</i> , 2003

Tabla 26. Comparación de resultados de celulosa con valor reportado en literatura

Celulosa			
Residuo	Este trabajo		Referencia
Bagazo de caña	43.98±1.58	46.32	Área <i>et al.</i> , 2002
Cascarilla de arroz	57.32±0.13	39.05	Valverde <i>et al.</i> , 2004
Residuos de piña	30.98±0.30	32.19	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2003

Tabla 27. Comparación de resultados de NKT con valor reportado en literatura

Nitrógeno			
Residuo	Este trabajo		Referencia
Bagazo de caña	0.13±0.01		
Cascarilla de arroz	0.17±0.01	0.21	Valverde <i>et al.</i> , 2004
Residuos de piña	0.43±0.05	1.16	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2003

Tabla 28. Comparación de resultados de proteína con valor reportado en literatura

Proteína			
Residuo	Este trabajo		Referencia
Bagazo de caña	0.78±0.04		
Cascarilla de arroz	1.08±0.05	3.56	Valverde <i>et al.</i> , (2004)
Residuos de piña	2.68±0.30	7.27	Gutiérrez <i>et al.</i> , (2003)

Tabla 29. Caracterización de la FORSA

Parámetro	FORSA
Humedad (%)	19.2±0.3
Sólidos totales (% en base húmeda)	80.8±0.3
Sólidos volátiles (% en base seca)	96.2±0.2
NKT (%)	0.18±0.05
pH	7.28±0.02
Ác. Orgánicos (mg/gbs)	
HAc ^a	1106.0
HBu ^b	220.9
Conductividad eléctrica (ms/m)	0.127±0.017
a _w	0.164
Ψ (MPa)	-238
CRA (gH ₂ O/gFORSA)	0.823±0.137

Nota: ^aÁcido acético, ^bÁcido butírico. No se detectó Ácido propiónico (HPr), Ácido láctico (HLac), Acetona, Metanol (MeOH), Etanol (EtOH), Butanol (BuOH).

El contenido de humedad de la FORSA es de 19%, y por lo tanto la cantidad de ST es de 80.8%, con este dato se hicieron los cálculos para determinar la cantidad de ST en la alimentación para cada una de las actividades posteriores. La humedad requerida en el sustrato, se acondicionó con solución amortiguadora de fosfatos. A pesar de la adición de lodos activados, la cantidad de NKT en la FORSA es baja (0.18%), se decidió no modificar este parámetro.

Otro parámetro importante es la conductividad eléctrica, la cual nos indica que el aporte de sales de la FORSA no contribuye a la presión osmótica. Por otro lado, la CRA determina la cantidad de agua que puede ser retenida en la FORSA, como se puede observar la FORSA puede absorber 82.3% su propio peso, a su vez el valor tan bajo de la a_w (0.164) nos sugiere que la FORSA sin acondicionar no permitiría el crecimiento microbiano en términos generales.

La a_w disminuye conforme aumenta la cantidad de ST en la FORSA como se observa en la figura 18, esto se cumple hasta 32% de ST, el potencial de agua (figura 19) sigue el mismo comportamiento, pero esto nos indica la presión que los microorganismos deben ejercer para poder extraer el agua de la FORSA, disponer de ella y así llevar a cabo su proceso metabólico además de tener la biodisponibilidad del sustrato.

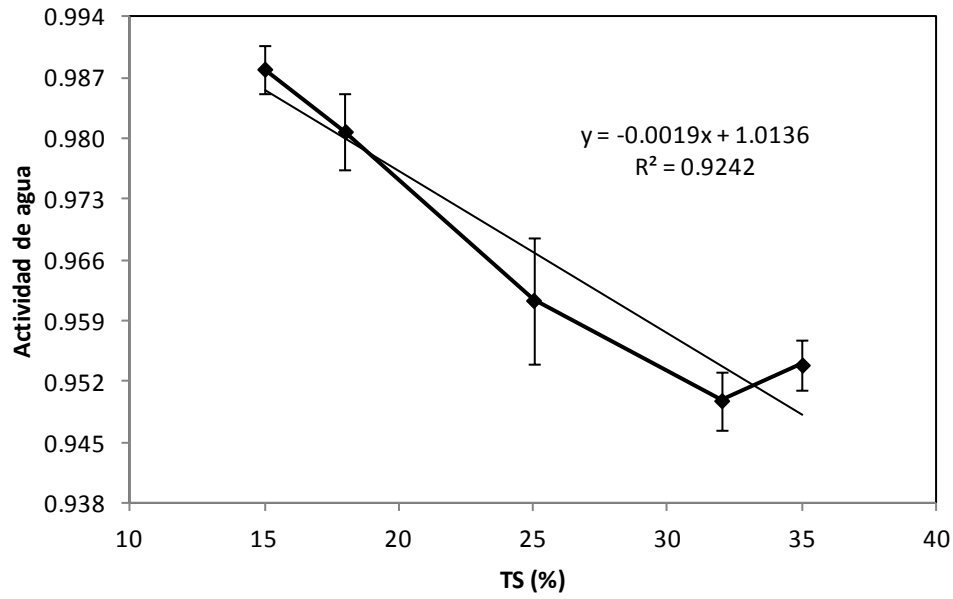


Figura 18. Actividad de agua de la alimentación a diferentes contenidos de sólidos totales.

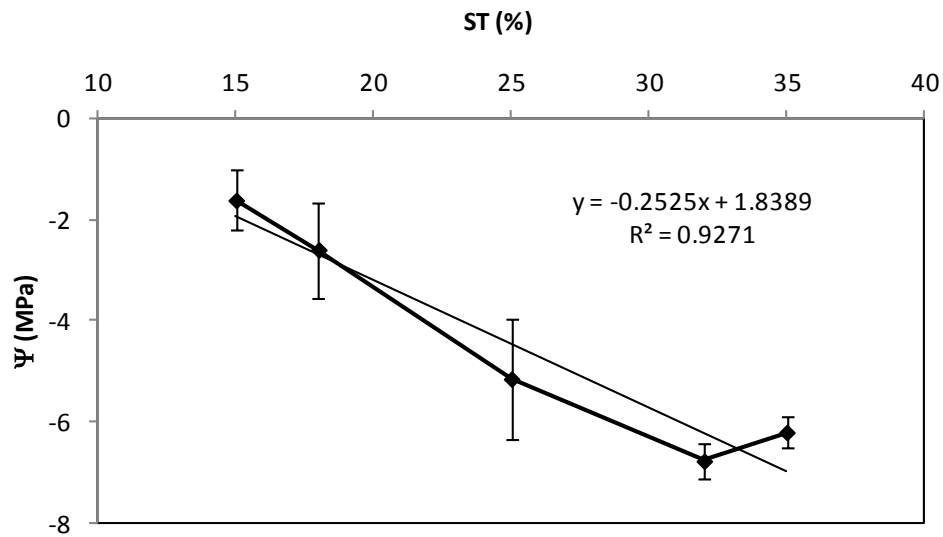


Figura 19. Potencial de agua de la alimentación a diferentes contenidos de sólidos totales.

Para la conductividad eléctrica se prepara soluciones patrón de KCl como se muestra en la tabla 30.

Tabla 30. Concentración y conductividad eléctrica esperada de la solución de KCl (modificado de Castellan, 1988)

Concentración (mol/L)	Conductividad eléctrica (mS/cm)
0.1	12.90
0.01	1.41
0.001	0.15

Los resultados de la conductividad eléctrica de la FORSA y de la FA se muestran en la tabla 31.

Tabla 31. Conductividad eléctrica del extracto de la FORSA y la FA a diferentes cantidades de sólidos totales en la alimentación

Sustrato	ST (%)	Conductividad eléctrica promedio mS/cm
FA	15.0	0.565 ± 0.008
FA	18.0	0.542 ± 0.009
FA	25.0	0.546 ± 0.026
FA	32.0	0.520 ± 0.008
FA	35.0	0.534 ± 0.011
FORSA	80.8	0.127 ± 0.017

Nota: FA=FORSA acondicionada (FORSA con solución amortiguadora de fosfatos a diferente cantidad de sólidos totales).

La conductividad eléctrica de la FORSA fue 0.127 ± 0.017 mS/cm este valor nos indica que el aporte de sales del sustrato no contribuye una presión osmótica al medio y por lo tanto podría suponerse que la presión osmótica es debida a la cantidad de ST. Sin embargo, la adición de la solución amortiguadora de fosfatos aumentó la conductividad eléctrica del extracto, esto podría deberse a que la

solución amortiguadora aporta especies iónicas que estarían afectando la disociación del agua (Castellan, 1988). Sin embargo, el uso de solución amortiguadora de fosfatos tiene un efecto positivo sobre la producción de H₂, ya que reduce la relación CO₂/H₂ (Wang *et al.*, 2006). Puede prevenir desviaciones de la fermentación hidrogenogénica por bajo pH (solventogénesis, lactogénesis) o por alto pH (metanogénesis).

7.2. Resultados y discusión de la actividad 2. Arranque y operación de digestores anaerobios de sustrato sólido metanogénico.

Se obtuvo un inóculo adecuado para la metanogénesis, el cual consistió en colocar una masa de 500g de inóculo “3/3” (descrito en la sección 6.2.2.2.) a reactor. Cada reactor tuvo volumen total de 1L, se gasearon con nitrógeno por 3 minutos para asegurar un ambiente anaerobio. Se ajustó la alcalinidad con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y se adiciona 2g de sacarosa/Kg. La adición de sacarosa se realizaba de acuerdo al desempeño de los DASSM hasta que la producción de metano en la mezcla gaseosa fue aproximadamente del 60%. En esta actividad los DASSM se incubaron en régimen mesofílico (35°C, DASSM-M) y régimen termofílico (55°C, DASSM-T). En esta etapa del proceso hubo desplazamiento volumétrico de salmuera.

Una vez estable la composición de CH_4 en el biogás, los DASSM-M se alimentaron con FORSA a 35% de ST en base húmeda, con TRM de 25d durante 38 días de operación. 8 DASSM-M se arrancaron y operaron, el seguimiento de la producción acumulada de biogás se muestra en la tabla 32. Los resultados indican que la producción de biogás fue baja, sobre todo en el DASSM-M-5. La producción de biogás se midió por desplazamiento volumétrico de salmuera. En la tabla 32, se muestra la producción acumulada de biogás, se observa que hubo periodos donde no se registra desplazamiento volumétrico de salmuera, pudo ocurrir que existieran fugas del biogás en el sistema, esto a pesar de que se periódicamente se monitoreaba el funcionamiento del dispositivo de medición. Sin embargo, se realizó el seguimiento y análisis de los parámetros; se encontraron resultados que indican actividad metabólica que pudiera traducirse en producción de biogás. Otra causal de esta baja producción pudo deberse a la alta cantidad de ST en la alimentación, provocando estrés osmótico en los microorganismos presentes y/o una lenta adaptación a un sustrato difícilmente asimilable.

En la tabla 33 se muestran todas las variables de respuesta que se evaluaron a lo largo de la operación de los DASSM-M. Se observa que la composición promedio de metano en el biogás durante los días de operación fue

alrededor de 27%, una composición menor a lo esperado ($\approx 60\%$). El pH se mantuvo ligeramente ácido lo que pudo provocar que el metano en la composición del biogás no fuera mayor, además hubo generación de ácido acético, propiónico y butírico, lo que pudo provocar el decremento ó la disminución de pH a pesar de usar solución amortiguadora de fosfato-carbonato. No hubo presencia de solventes.

En las figuras 20-23 se muestra el comportamiento de los DASSM en régimen mesofílico. Se observó que en el día 7, la producción de biogás y la composición de metano en el mismo fueron menores a 15%, por lo que se inyectó un pulso de bicarbonato de sodio, representado en las gráficas como "B", que consistió en 1 mL de una solución saturada. Para el día 15 hubo una mayor presencia de metano en el biogás para la mayoría de los digestores, excepto el DASSM-M 6, los DASSM-M 2 y 8 presentaron un aumento de metano en su composición pero una disminución brusca para el día 15, se alimentó con FA, representado en la gráfica con "F", para un TRM de 40d, la alimentación se acondicionó con 0.5g de bicarbonato de sodio para mantener el pH cercano a 7.0, con esta estrategia se pretendía que la producción de biogás y la composición de metano en el mismo se mantuvieran estables, esta alimentación acondicionada se representa con F-B en las gráficas (figuras 20-23).

La producción de biogás en los DASSM-M 2 (figura 20b), DASSM-M 4 (figura 21b), DASSM-M 5 (figura 22a) y DASSM-7 (figura 23a) no se presentó o al menos no se pudo registrar ya que no hubo desplazamiento de salmuera. Por otro lado el porcentaje de metano aumentó y se mantuvo relativamente constante, para casi todos los DASSM-M, excepto para DASSM-M5 (figura 22a) y DASSM-7 (figura 23a). El pH se monitoreó en las purgas, permaneció ligeramente ácido en promedio (tabla 33), aun cuando se empleó una solución amortiguadora de fosfatos-bicarbonato de sodio. El pH ligeramente ácido no favorece la metanogénesis; esto pudo generar que la metanogénesis en algunos casos como el DASSM-M 5 y 7, se desplomará y a pesar de intervenir el pH, el CH_4 no repuntará.

Tabla 32. Seguimiento de la producción acumulada de biogás en los DASSM-M

Día de operación	DASSM-M							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	436.65	303.61	409.36	477.59	0.00	405.95	0.00	0.00
3	674.76	303.61	409.36	675.44	0.00	467.35	0.00	231.97
4	845.33	303.61	409.36	805.07	0.00	535.58	0.00	368.42
7	968.14	303.61	573.10	907.41	0.00	569.69	0.00	368.42
10	968.14	303.61	573.10	907.41	0.00	672.03	0.00	368.42
14	1009.07	371.84	573.10	907.41	47.76	672.03	102.34	436.65
16	1009.07	371.84	955.17	907.41	47.76	910.83	102.34	436.65
17	1077.30	405.95	1193.97	941.53	47.76	2070.68	102.34	436.65
21	1077.30	405.95	1412.29	941.53	47.76	2179.84	102.34	436.65
22	1411.61	405.95	1698.84	1180.32	47.76	2398.17	102.34	1057.51
23	1411.61	405.95	1828.47	1316.77	204.68	2500.51	102.34	1487.34
24	1479.84	405.95	1828.47	1316.77	204.68	2568.73	102.34	1814.83
25	1479.84	405.95	1828.47	1385.00	204.68	2568.73	136.45	1964.93
32	1820.97	405.95	1930.81	1453.23	204.68	2705.19	136.45	2442.51
34	2025.65	440.06	2271.95	1521.45	204.68	3114.55	204.68	2510.74
38	2025.65	440.06	2340.17	1521.45	204.68	3114.55	204.68	2510.74

Tabla 33. Parámetros medidos en los DASSM-M

Parámetro	DASSM-M							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Producción de biogás (NmL _{bg} /Kg/d)	121±111	29±45	138±103	100±104	12±21	187±188	12±14	148 ±184
Q _{bg} (NmL _{bg} /d)	60±55	14±23	69±51	50±52	6±11	93±94	6±7	74±92
CH ₄ (%)	24±10	31±13	28±11	29±12	23±13	20±10	21±12	34±15
Producción de CH ₄ (NmL _{CH4} /Kg/d)	19±20	3±5	33±35	16±20	3±5	36±43	3±5	59±86
Q _{CH4} (NmL _{CH4} /d)	10±10	2±2	16±18	8±10	2±3	18±21	2±2	29±43
ST (%)	31.71±0.87	32.58±1.29	32.54±0.52	32.41±0.67	32.83±0.93	32.47±1.44	31.74±1.42	33.24±0.79
SV (%)	52.29±3.21	69.29±4.19	66.20±3.01	70.93±8.51	69.93±4.13	70.58±6.92	74.48±4.51	78.04±3.69
Eficiencia de remoción de SV, η _{SV} (%)	78±14	35±18	35±13	36±14	29±15	29±17	33±13	33±16
α	1.6±0.8	1.9±0.7	1.8±0.5	1.7±0.7	2.3±1.2	0.6±0.04	1.2±0.5	1.4±0.7
pH	6.6±0.5	6.2±0.4	6.1±0.4	6.3±0.5	6.2±0.6	6.3±0.6	6.3±0.6	6.4±0.8
ácido acético (mgDQO/Kgss)	437±26	0±0	384±49	366±112	256±256	381±34	330±30	288±43

Continuación de Tabla 33. Parámetros medidos en los DASSM-M

Parámetro	DASSM-M							
	1	2	3	4	5	6	7	8
ácido propiónico (mgDQO/Kgss)	2578±470	1251±1251	2257±2257	2404±2404	2705±1370	2850±875	1653±438	1653±464
ácido butírico (mgDQO/Kgss)	312 ± 16	154 ± 154	216 ± 110	208 ± 122	250 ± 108	315 ± 85	128 ± 22	128 ± 34
acetona (mgDQO/Kgss)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
etanol (mgDQO/Kgss)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
metanol (mgDQO/Kgss)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
butanol (mgDQO/Kgss)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Periodo de mejor desempeño								
Producción de biogás (NmL _{bg} /Kg/d)	201 ± 111	92 ± 62	229 ± 83	166 ± 112	58 ± 31	273 ± 201	37 ± 11	235 ± 210
Q _{bg} (NmL _{bg} /d)	101 ± 55	46 ± 31	115 ± 41	83 ± 56	29 ± 15	136 ± 100	19 ± 6	118 ± 105
Producción de CH ₄ (NmL _{CH4} /Kg/d)	32 ± 21	10 ± 7	54 ± 38	27 ± 23	17 ± 6	52 ± 47	11 ± 6	93 ± 101
Q _{CH4} (NmL _{CH4} /d)	16 ± 10	5 ± 3	27 ± 38	13 ± 11	8 ± 3	26 ± 24	5 ± 3	47 ± 51

Nota: ND= no detectable; las desviaciones estándar en cada reactor, representa su variación en el tiempo.

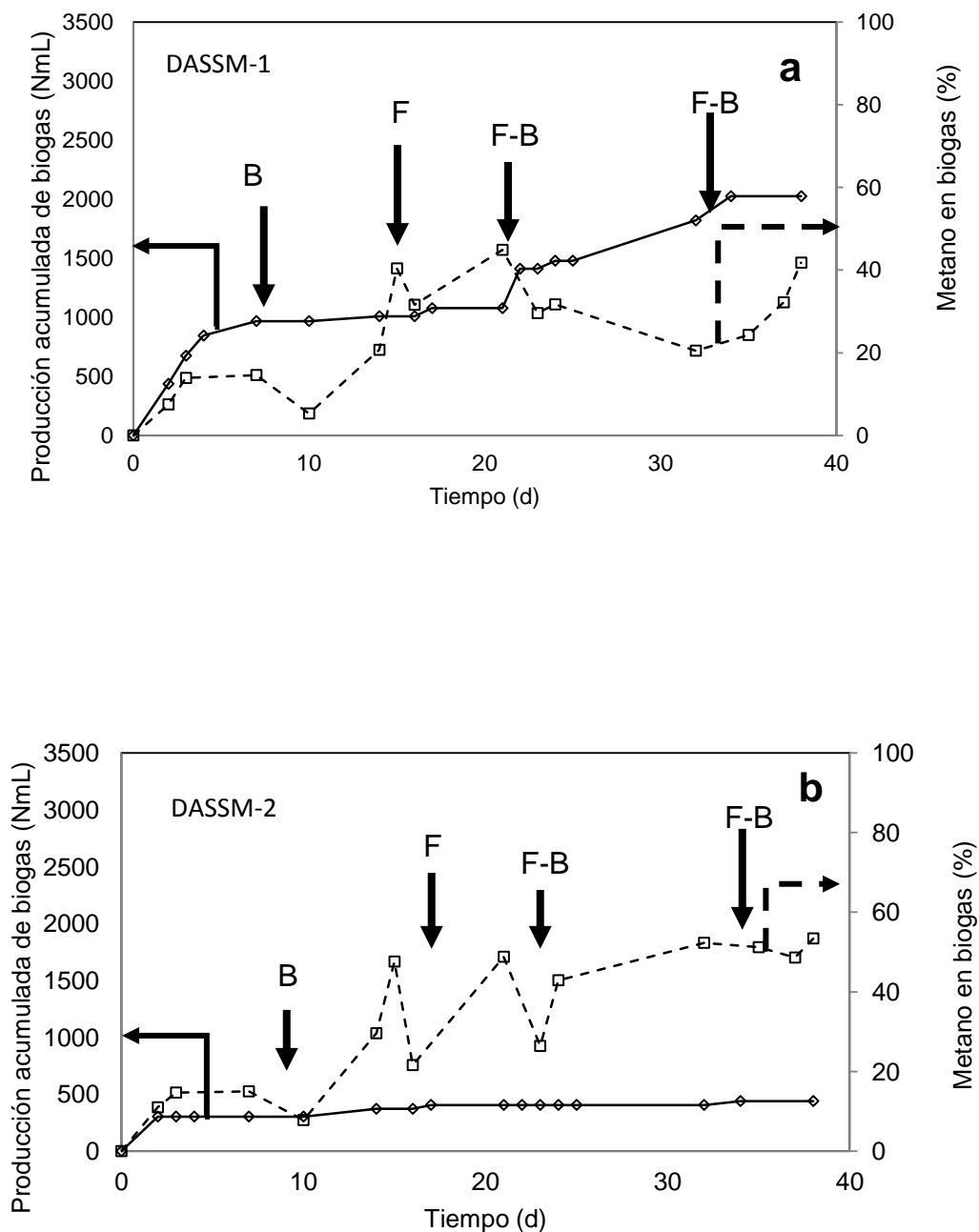


Figura 20. Producción acumulada de biogás y % de metano en: (a) DASSM-M 1 y (b) DASSM-M 2

(B=Pulso de bicarbonato de sodio, F=alimentación con FORSA, F-B: alimentación con FORSA + 0.5g de bicarbonato de sodio)

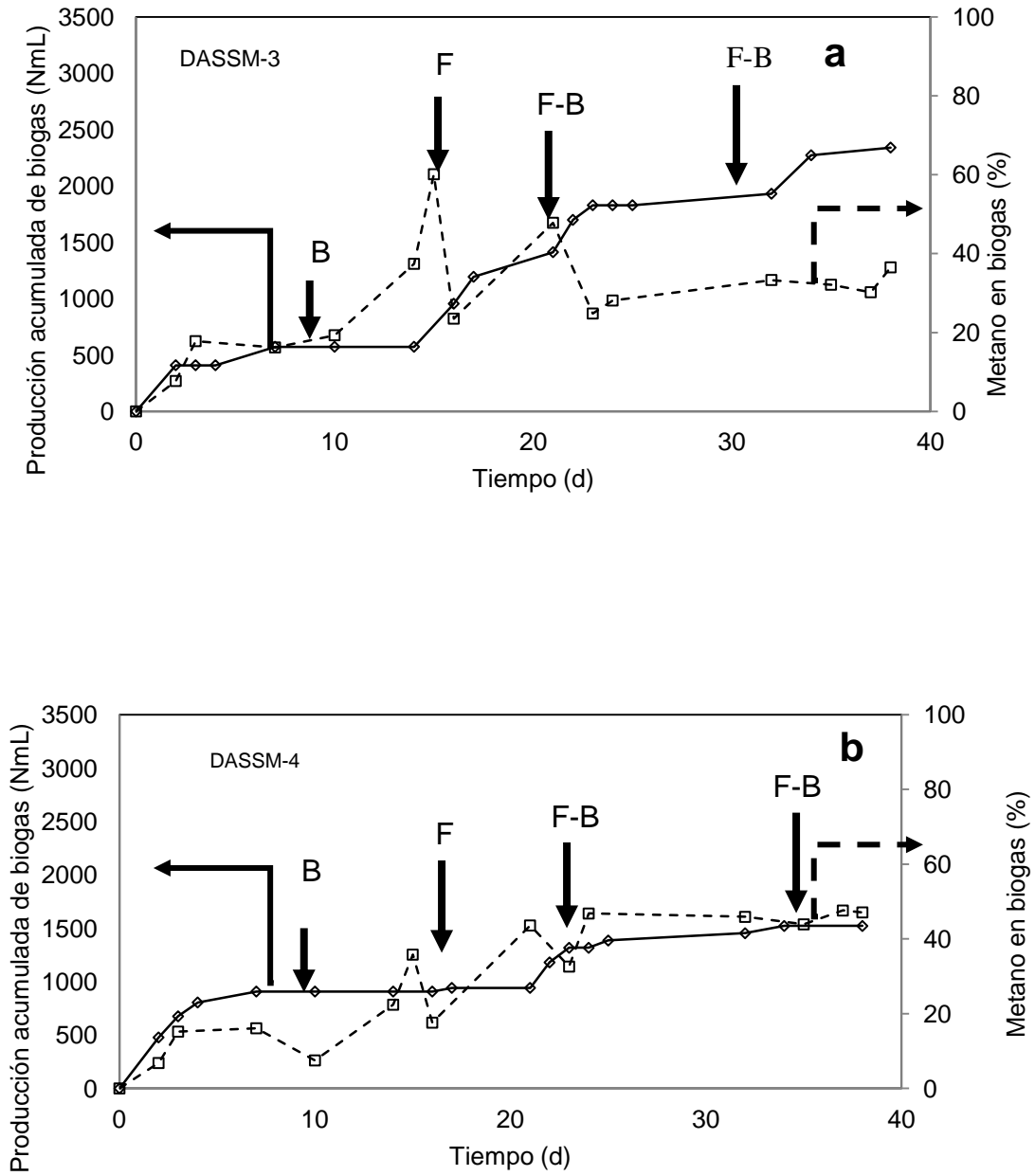


Figura 21. Producción acumulada de biogás y % de metano en: (a) DASSM-M 3 y (b) DASSM-M 4 (B=Pulso de bicarbonato de sodio, F=alimentación con FORSA, F-B: alimentación con FORSA + 0.5g de bicarbonato de sodio)

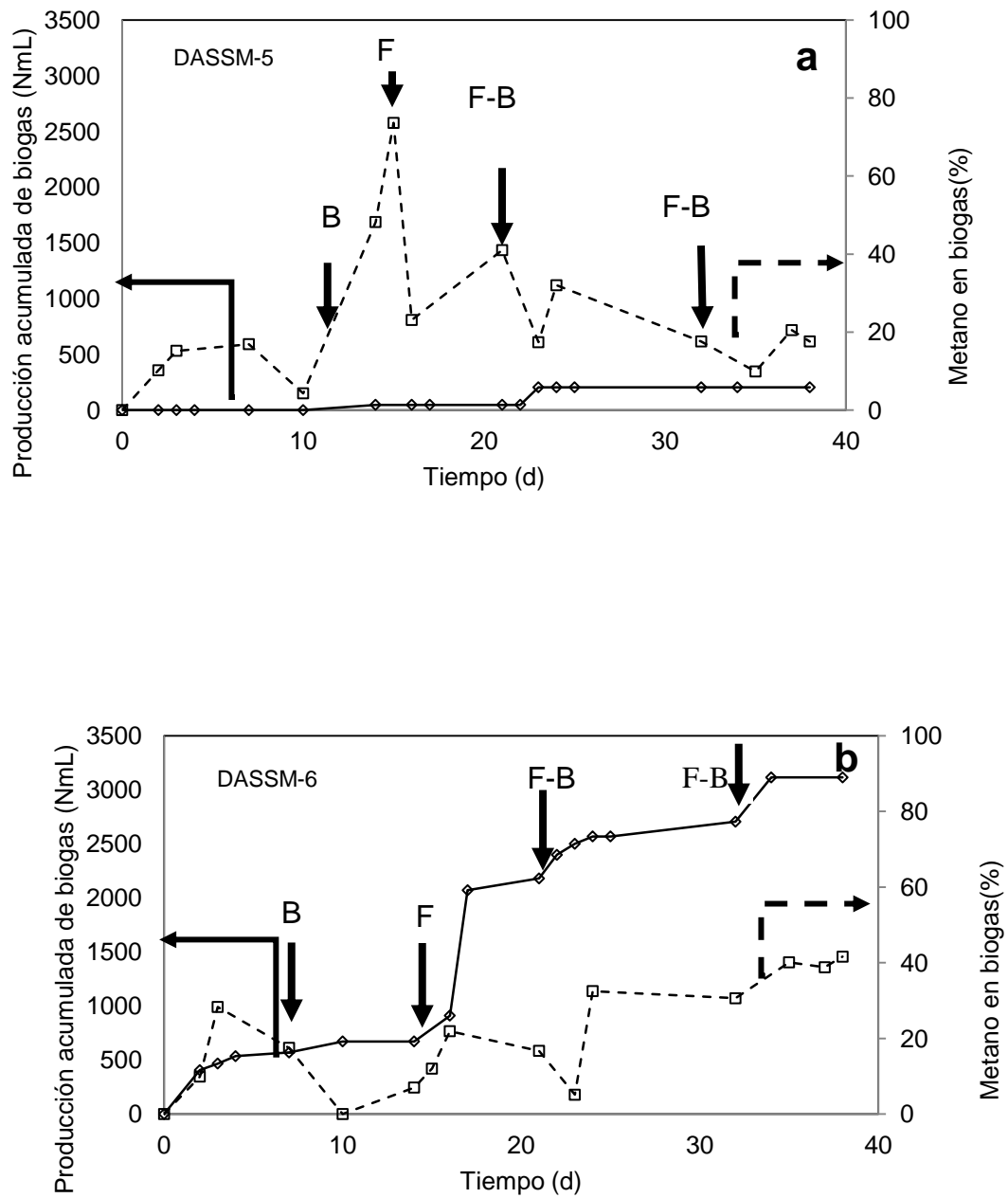


Figura 22. Producción acumulada de biogás y % de metano en:

(a) DASSM-M 5 y (b) DASSM-M 6

(B=Pulso de bicarbonato de sodio, F=alimentación con FORSA,
 F-B: alimentación con FORSA + 0.5g de bicarbonato de sodio)

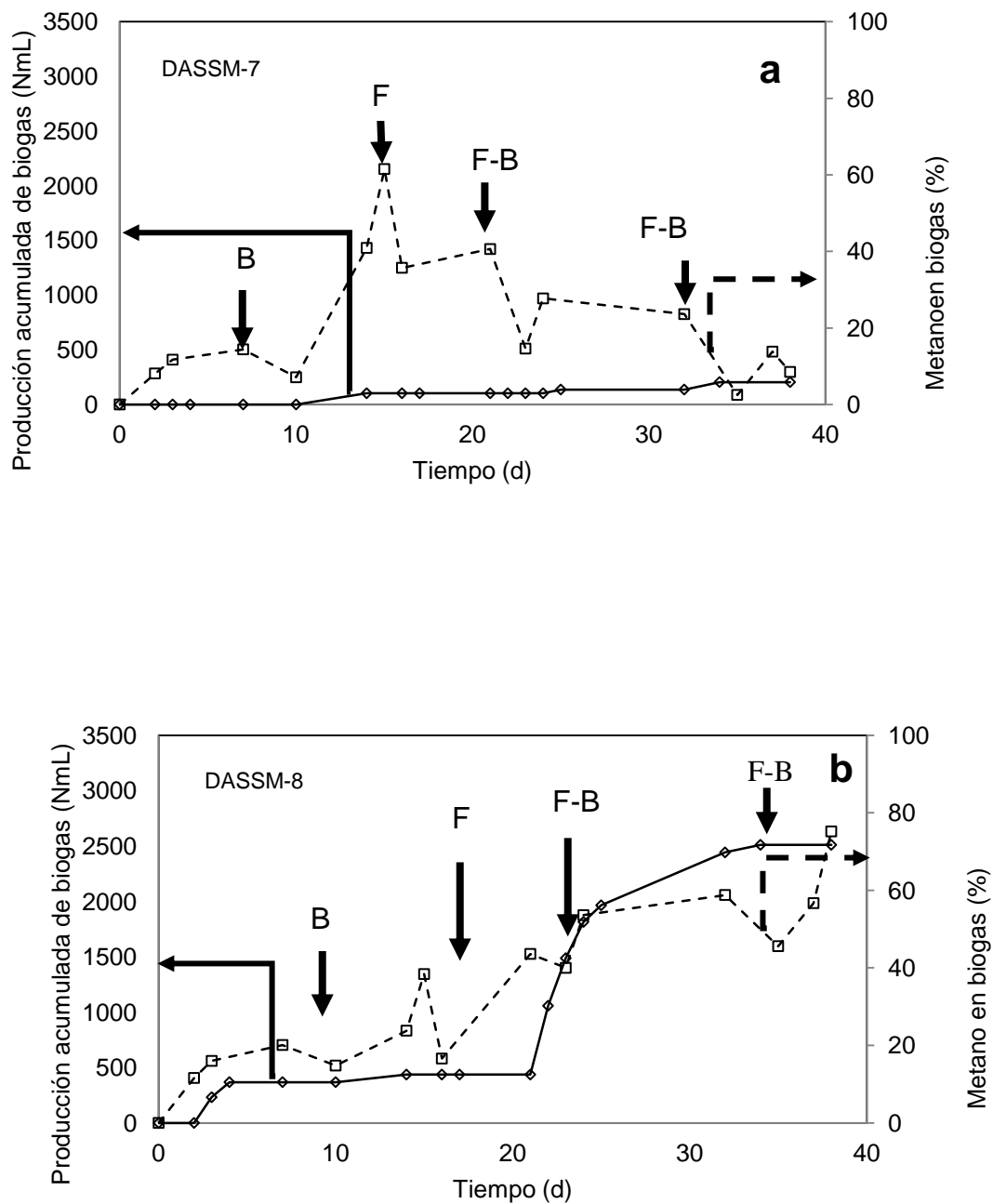


Figura 23. Producción acumulada de biogás y % de metano en:

(a) DASSM-M 7 y (b) DASSM-M 8

(B=Pulso de bicarbonato de sodio, F=alimentación con FORSA, F-B: alimentación con FORSA + 0.5g de bicarbonato de sodio)

Para la realización de la actividad 3b se arrancaron y monitorearon 8 DASSM-T incubados a 55°C, en la tabla 34 se muestra la producción acumulada de biogás y se observa que hubo periodos largos donde no se pudo medir la generación del mismo. En la tabla 35 se presentan los promedios de metano (%) en el biogás, se observa que el porcentaje del mismo fue muy bajo. En el anexo B se incluyeron las gráficas de dicho monitoreo.

Tabla 34. Seguimiento de la producción acumulada de biogás (NmL) en los DASSM-T

Día de operación	DASSM-T							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0.00
2	22.57	0	345.53	0.00	0.00	211.55	70.52	267.96
3	22.57	0	377.26	0.00	104.36	211.55	70.52	267.96
4	22.57	0	729.84	0.00	104.36	211.55	70.52	338.48
7	22.57	0	729.84	43.72	110.01	219.31	70.52	338.48
10	22.57	0	729.84	43.72	110.01	286.30	70.52	338.48
14	22.57	0	729.84	466.82	315.91	286.30	235.52	338.48
16	22.57	0	736.89	466.82	315.91	286.30	235.52	338.48
17	873.70	0	736.89	466.82	950.56	568.36	235.52	1121.21
21	990.75	0	1726.94	471.75	1771.37	775.68	373.74	1379.30
22	1089.47	13.40	1726.94	504.19	1771.37	930.81	373.74	1478.02
23	1089.47	13.40	1726.94	504.19	2593.58	930.81	530.28	2429.99
24	1095.12	13.40	2652.11	504.19	2593.58	935.75	552.85	3227.52
25	1182.56	894.85	2821.35	504.19	3383.37	1062.68	637.47	5828.16
32	2106.32	1790.41	2821.35	638.17	3383.37	1062.68	637.47	5940.28
34	2180.36	1832.72	2821.35	638.17	3404.52	1122.62	637.47	6328.12
38	2180.36	1832.72	2821.35	1484.37	3404.52	1122.62	637.47	6328.12

Tabla 35. Parámetros medidos en los DASSM-T

Parámetro	DASSM-T							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Producción de biogás (NmL _{bg} /Kg/d)	59±64	31±47	88±66	69±144	133±125	41±27	33±55	230±130
Q _{bg} (NmL _{bg} /d)	30±32	16±24	44±33	34±72	67±63	21±13	17±28	115±65
CH ₄ (%)	4±3	9±13	7±7	8±13	10±16	10±15	16±17	17±19
Producción de CH ₄ (NmL _{CH4} /Kg/d)	0.4±0.6	0.2±0.3	5.4±10.8	0.2±0.4	6.7±19.5	1.5±4.2	2.2±4.5	22.7±46.6
Q _{CH4} (NmL _{CH4} /d)	0.2±0.3	0.1±0.1	2.7±5.4	0.1±0.2	3.3±9.7	0.7±2.1	1.1±2.2	11.4±23.3
ST (%)	33.73±0.36	32.41±1.48	32.17±1.68	31.54±0.54	31.71±2.02	32.95±1.35	32.95±0.68	34.20±2.24
SV (%)	78.25±13.43	59.23±6.11	58.87±5.02	51.07±4.79	53.20±4.42	50.87±3.08	59.40±9.47	57.53±5.56
Eficiencia de remoción de SV, η _{SV} (%)	21.53±9.43	35.40±6.08	36.87±6.56	45.07±5.02	42.87±5.79	45.20±4.42	36.13±10.46	37.40±7.47
α	-	-	-	-	-	-	-	-
pH	-	-	-	-	-	-	-	-
ácido acético (mgDQO/Kgss)	2E-4±1E-5	0 ± 0	1E-4±2E-5	1E-4±5E-5	1E-4±1E-4	1E-4±2E-5	1E-4±1E-5	1E-4±2E-5
ácido propiónico (mgDQO/Kgss)	1E-4±2E-5	1E-4±5E-5	1E-4±1E-4	1E-4±1E-4	1E-4±6E-5	1E-4±4E-5	1E-4±2E-5	1E-4±2E-5

Continuación de Tabla 35. Parámetros medidos en los DASSM-T

Parámetro	DASSM-T							
	1	2	3	4	5	6	7	8
ácido butírico (mgDQO/Kgss)	1E-4±1E-5	1E-4±6E-5	1E-4±4E-4	1E-4±5E-4	1E-4±4E-5	1E-4±3E-5	1E-4±1E-5	5E-5±1E-5
acetona (mgDQO/Kgss)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
etanol (mgDQO/Kgss)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
metanol (mgDQO/Kgss)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
butanol (mgDQO/Kgss)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Nota: ND = no detectado. Las desviaciones estándar en cada reactor, representa su variación en el tiempo. No hubo periodo de mejor desempeño.

7.3a. Resultados de la actividad 3a. Manejo de digestores anaerobios de sustrato sólido acidogénico mesofílico (DASSA-M)

Se realizó la sobre carga de los DASSM-M para convertirlos en DASSA-M, se operaron como DASSA por 108 días, Se evaluaron 4 diferentes TRM, 22d (DASSA-M 1 y 2), 13d (DASSA-M 3 y 4), 10d (DASSA-M 5 y 6) y 7d (DASSA-M-7 y 8) con sus respectivas cargas orgánicas (15, 25, 35 y 45 Kg SV/(Kg.d)), fueron 4 UE, por duplicado dando 8 UE totales. La FORSA se acondicionó a 35% de ST, el contenido de humedad del sustrato se ajustó con soluciones amortiguadoras de fosfatos. Se controló el pH en un intervalo de 5.5 a 6.6, el pH fue intervenido con sosa concentrada.

En la tabla 36 se presentan los resultados promedio de las variables de respuesta a los diferentes TRM, la alimentación se acondicionó a 35% de sólidos totales. Los DASSA-M que mostraron mayor producción de hidrógeno fueron los de TRM 13 y 10d. El pH es similar para todos los TRM evaluados. La mayor concentración de etanol (único solvente encontrado en los reactores) se vio favorecida para un TRM de 22d, aunque la cantidad es muy baja (0.45 gDQO/Kg_{ss}). La presencia del ácido propiónico fue predominante en todos los digestores, seguida por el ácido acético y por último el ácido butírico.

El comportamiento en general fue pobre, hubo un ligero efecto del TRM en la producción de hidrógeno, los mejores resultados fueron a 13d de TRM.

Respecto a la concentración de metabolitos orgánicos, aumenta ligeramente la proporción de ácidos orgánicos al aumentar la carga orgánica en la alimentación.

La mayor productividad de biogás fue a 10d de TRM comparado con los otros TRM. Sin embargo, la mayor producción de hidrógeno fue a 13d TRM (figuras 24-27).

Tabla 36. Parámetros medidos en los DASSA-M

Parámetro	TRM			
	22	13	10	7
Producción de biogás (NmL _{bg} /Kg/d)	15±3.0	38.5±4.5	45±40.0	30.5±25.5
Q _{bg} (NmL _{bg} /d)	7.5±1.5	19±2.0	22.5±20.5	15.5±12.5
Contenido de CH ₄ (%)	0.705±0.3	0.355±0.2	1.455±0.6	1.445±1.1
Producción de CH ₄ (NmL _{CH4} /Kg/d)	0±0.0	0±0.0	0.65±0.7	0.55±0.6
Q _{CH4} (NmL _{CH4} /d)	0±0.0	0±0.0	0.3±0.3	0.25±0.3
Contenido de H ₂ (%)	0.83±0.1	0.83±0.0	0.70±0.1	0.91±0.2
Producción de H ₂ (NmL _{H2} /Kg/d)	0.4±0.4	2.3±0.6	0.2±0.1	0.35±0.3
Q _{H2} (NmL _{H2} /d)	0.2±0.2	1.1±0.3	0.1±0.1	0.15±0.2
ST (%)	32.14±0.44	33.28±0.13	33.15±0.32	32.49±0.75
SV (%)	75.05±6.24	82.34±1.86	79.83±2.90	79.24±3.06
Eficiencia de remoción de SV, η _{sv} (%)	36.07±1.39	40.49±3.83	39.75±2.95	36.32±0.63
pH	6.21±0.2	5.83±0.03	5.87±0.1	6.01±0.0
Ácido acético (mgDQO/Kgss)	350±9.0	552±64.0	462.5±1.5	538±46.0
Ácido propiónico (mgDQO/Kgss)	1746±8	2308±219	2294±84	1991±33
Ácido butírico (mgDQO/Kgss)	284±40	389±63	339±0.5	366±14
Acetona (mgDQO/Kgss)	ND	ND	ND	ND
Etanol (mgDQO/Kgss)	0.45±0.5	0±0.0	0±0.0	0±0.0
Metanol (mgDQO/Kgss)	ND	ND	ND	ND
Butanol (mgDQO/Kgss)	ND	ND	ND	ND

Continuación de Tabla 36. Parámetros medidos en los DASSA-M

Parámetro	TRM			
	22	13	10	7
Periodo de mejor desempeño				
Producción de biogás (NmL _{bg} /Kg/d)	169±70	271±13	158±108	120±84
Q _{bg} (NmL _{bg} /d)	84±35	136±7	79±54	60±42
Contenido de CH ₄ (%)	16.87±7.1	7.25±7.3	31.72±12.3	27.75±18.3
Producción de CH ₄ (NmL _{CH4} /Kg/d)	0±0	0±0	1.95±2	1.95±2
Q _{CH4} (NmL _{CH4} /d)	0±0	0±0	1±1	1±1
Contenido de H ₂ (%)	12.83±1.2	13.97±0.8	15.17±2.2	16.45±4.5
Producción de H ₂ (NmL _{H2} /Kg/d)	3.2±3.2	17.3±7.0	0.85±0.2	1.25±0.8
Q _{H2} (NmL _{H2} /d)	1.6±1.6	8.6±3.5	0.45±0.1	0.65±0.4

Nota: ND = no detectado. Las desviaciones estándar representan la variación entre réplicas.

Se obtuvo una producción inicial de hidrógeno pero solo por periodos cortos y bajo porcentaje del mismo en el biogás, Por otro lado, la producción de metano continuó para todos los DASSA en los primeros días, posteriormente no se detectó (figuras C1-C4, anexo C). A pesar de los resultados se realizaron las determinaciones y se presenta una remoción de sólidos totales que van desde 35 hasta 44%, los pH son ligeramente ácidos, podría deberse a la generación de ácidos orgánicos y a que en esta fase experimental se uso una solución amortiguadora de fosfato-fosfato en lugar de la de fosfato-carbonato. No se detectaron solventes. Estos resultados pobres se debieron muy probablemente a la alta concentración de ST en la alimentación. Por ese motivo, se planteó la actividad 3c.

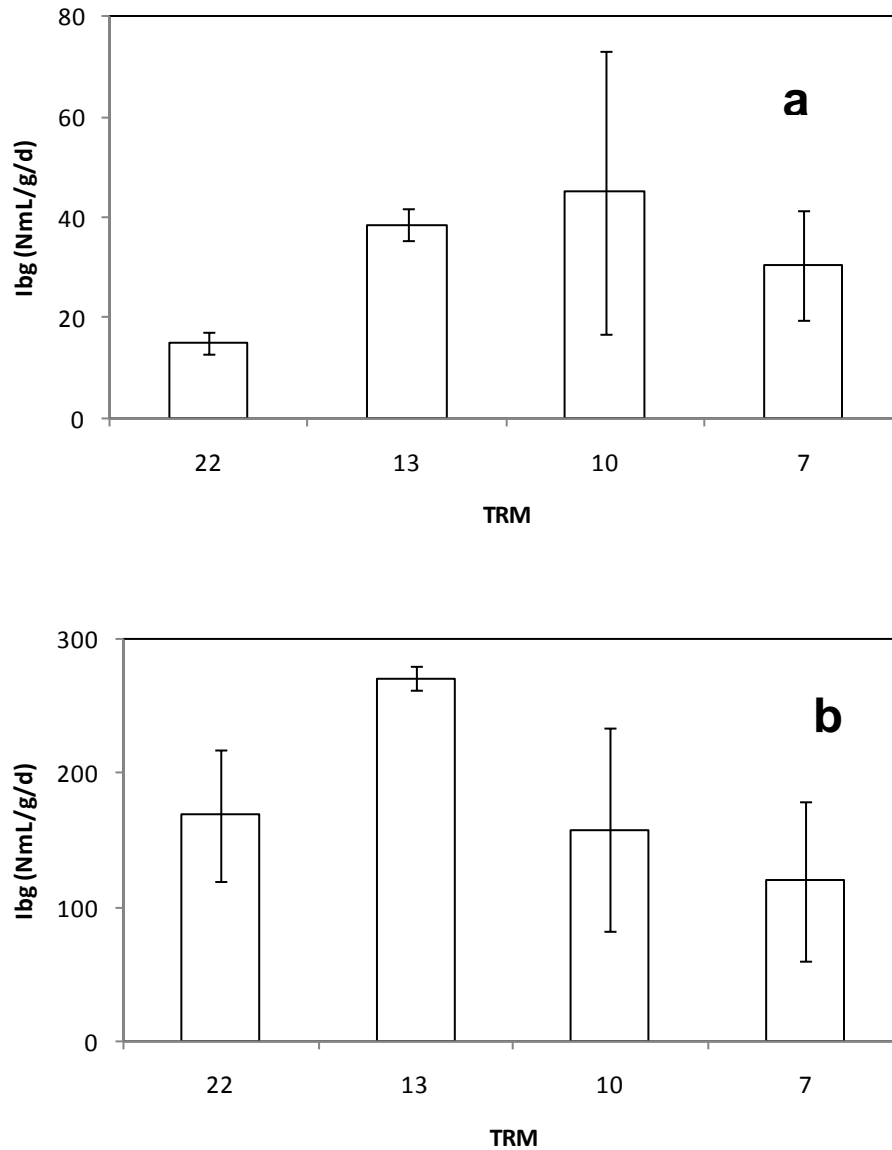


Figura 24. Efecto del TRM sobre la producción de biogás: a) durante todos los días de operación; b) en los días de mejor desempeño (las desviaciones estándar representan la variación de las réplicas).

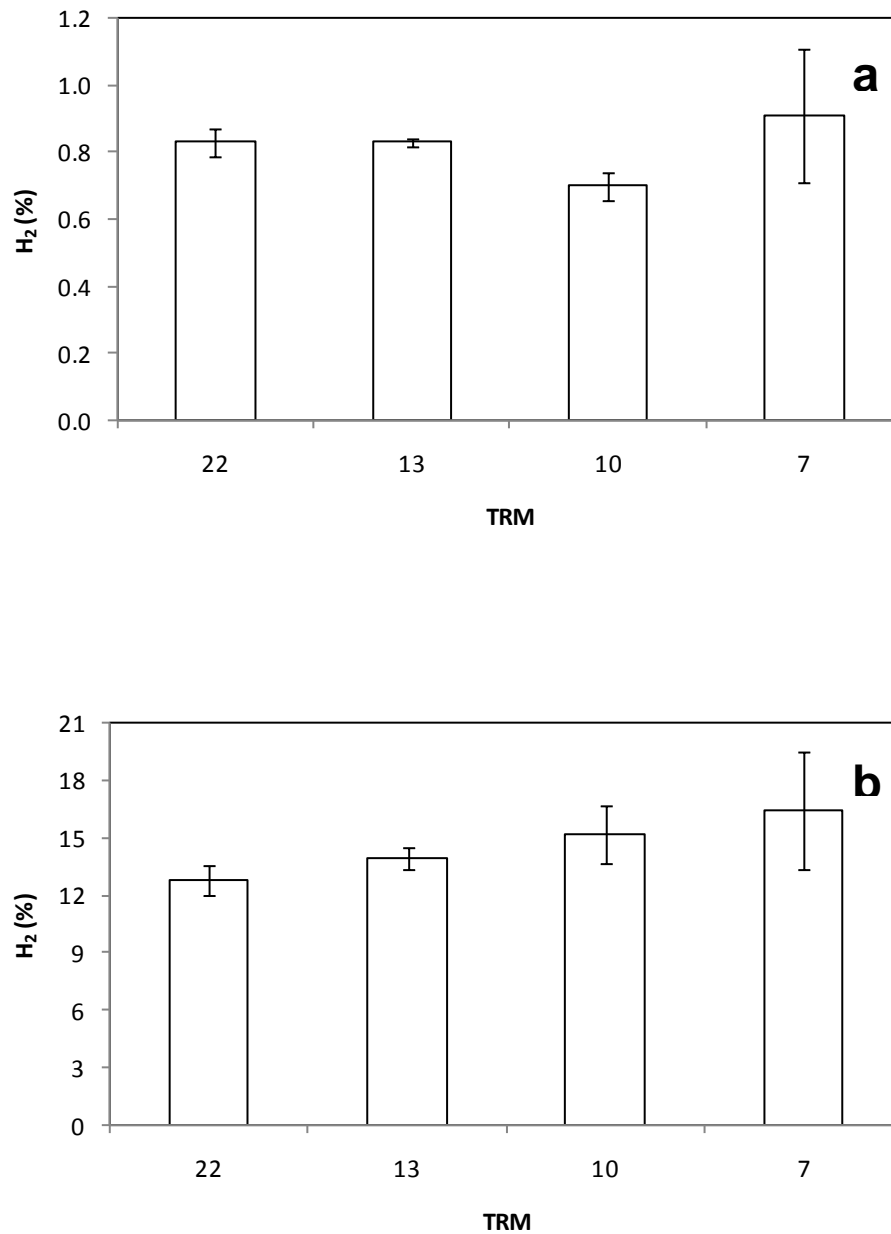


Figura 25. Efecto del TRM sobre la producción de H₂ (%):a) durante todos los días de operación; b) en los días de mejor desempeño (las desviaciones estándar representan la variación de las réplicas).

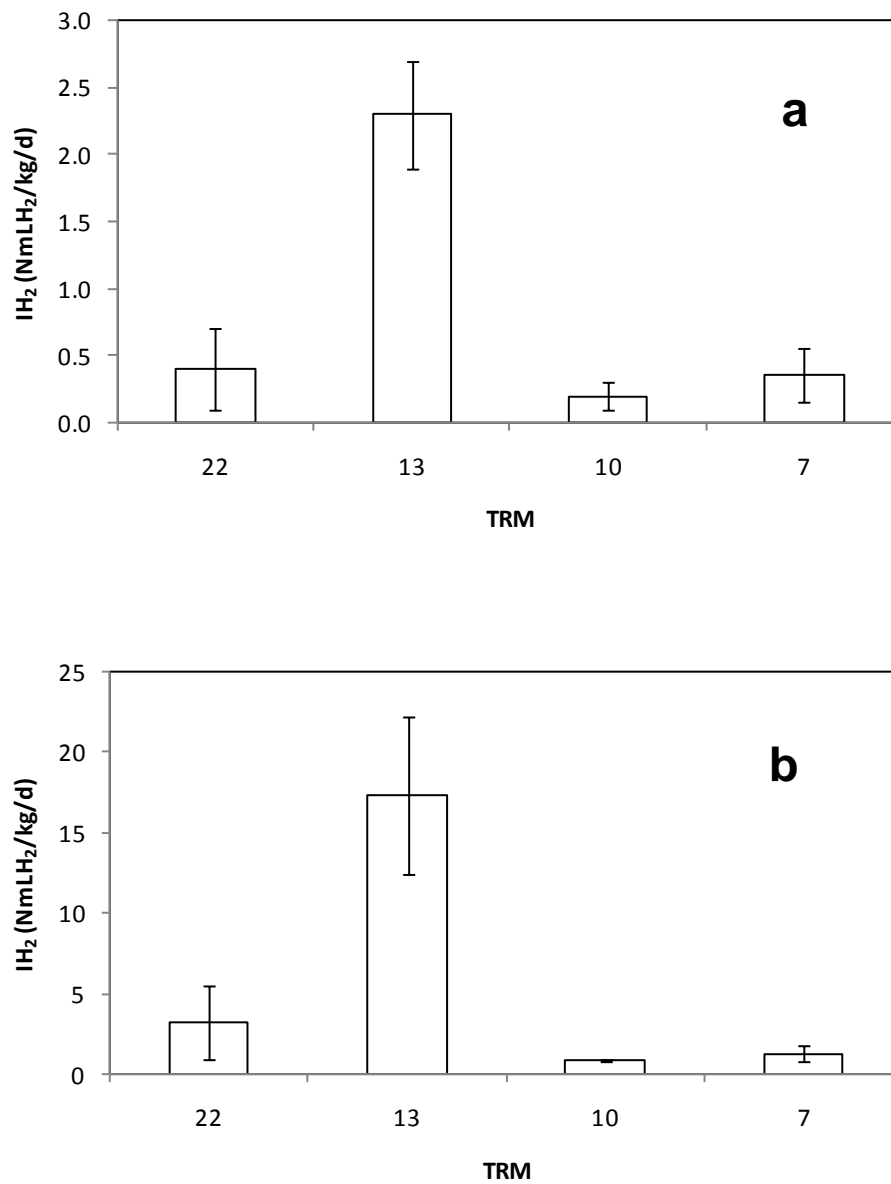


Figura 26. Efecto del TRM sobre la producción de H₂ (NmL/Kg/d):a) durante todos los días de operación; b) en los días de mejor desempeño (las desviaciones estándar representan la variación de las réplicas).

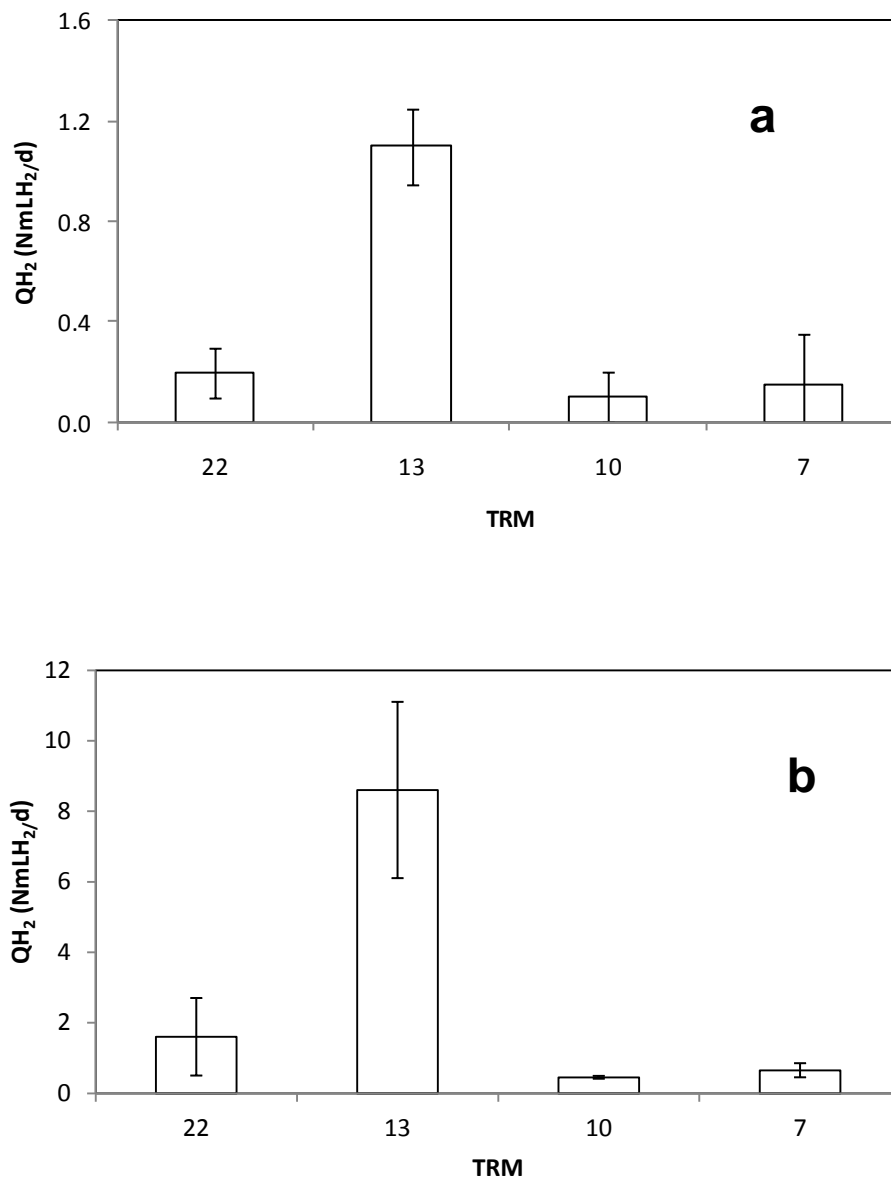


Figura 27. Efecto del TRM sobre la productividad de H₂ (NmL/d):a) durante todos los días de operación; b) en los días de mejor desempeño (las desviaciones estándar representan la variación de las réplicas).

7.3b. Resultados de la actividad 3b. Manejo de digestores anaerobios de sustrato sólido acidogénico termofílico (DASSA-T)

Los resultados en esta etapa del proyecto no se pudieron determinar ya que no fue posible medir la producción de biogás. Sin embargo se monitoreó la presencia de metano y hidrógeno en el biogás. Los resultados se presentan en la tabla 37; hubo mayor presencia de metano que de hidrógeno, no se empleó algún inhibidor de metanogénesis. A pesar de no poder medir la producción y la productividad, se monitoreo los sólidos totales y los sólidos volátiles; así como el pH, el cual estuvo en promedio en 5.85-6.85. No se determinó los ácidos orgánicos y solventes en esta fase.

Tabla 37. Parámetros medidos en los DASSA-T

Parámetro	TRM			
	22	13	10	7
Producción de biogás (NmL _{bg} /Kg/d)	ND	ND	ND	ND
Q _{bg} (NmL _{bg} /d)	ND	ND	ND	ND
Contenido de CH ₄ (%)	14.50±3.89	11.00±2.47	31.50±6.01	14.00±2.83
Producción de CH ₄ (NmL _{CH4} /Kg/d)	ND	ND	ND	ND
Q _{CH4} (NmL _{CH4} /d)	ND	ND	ND	ND
Contenido de H ₂ (%)	4.00±3.54	6.00±5.66	7.50±7.07	9.51±5.66
Producción de H ₂ (NmL _{H2} /Kg/d)	ND	ND	ND	ND
Q _{H2} (NmL _{H2} /d)	ND	ND	ND	ND
ST (%)	32.50±0.71	32.00±1.06	32.15±1.62	32.49±1.05
SV (%)	67.05±2.84	65.00±2.12	67.00±2.12	67.24±1.77
Eficiencia de remoción de SV, η _{sv} (%)	41.00±8.13	23.00±6.72	22.00±7.42	32.02±0.49
pH	5.97±0.29	5.85±0.28	5.90±0.43	6.85±0.49
Ácido acético (mgDQO/Kgss)	ND	ND	ND	ND
Ácido propiónico (mgDQO/Kgss)	ND	ND	ND	ND
Ácido butírico (mgDQO/Kgss)	ND	ND	ND	ND
Acetona (mgDQO/Kgss)	ND	ND	ND	ND
Etanol (mgDQO/Kgss)	ND	ND	ND	ND
Metnaol (mgDQO/Kgss)	ND	ND	ND	ND
Butanol (mgDQO/Kgss)	ND	ND	ND	ND

Nota: ND = no detectado, las desviaciones estándar son las variaciones de las réplicas.

7.3c. Resultados y discusión de la actividad 3c. Operación de minireactores en fermentación anaerobia hidrogenogénica en sustrato sólido con venteo intermitente (FASSH-VI).

Para este experimento se montó y operó un DASSM en régimen mesofílico, se mantuvo metanogénico alimentado con FORSA y cuando se obtuvo una producción de metano aproximadamente del 50% se usó como inóculo.

Para el experimento de los FASSH-VI se utilizaron diferentes soluciones amortiguadoras de fosfatos (tabla 22), para obtener las mezclas de FA con el contenido de sólidos totales y pH que se requerían para el experimento (tabla 19).

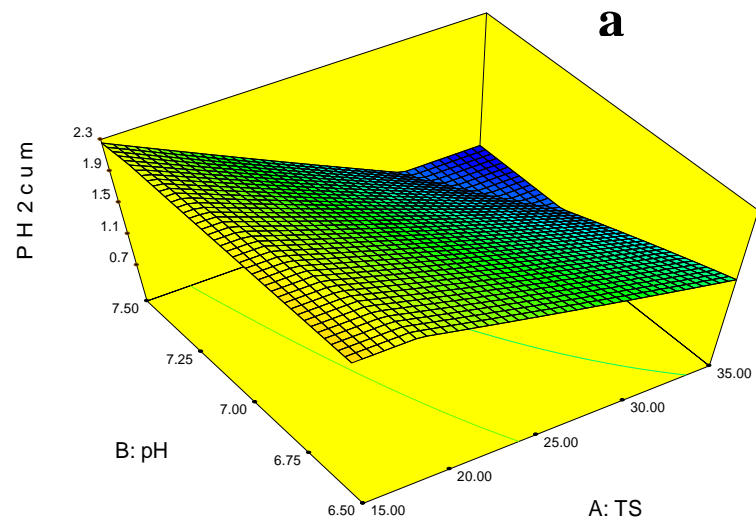
En los FASSH-VI, se monitoreó el biogás y se corroboró la ausencia de metano en los primeros ciclos de producción. Respecto a la producción de hidrógeno en reactores por lote, se obtuvo la mayor producción de hidrógeno en el tratamiento 1 ($3.03 \text{ mmolH}_2/\text{g}_{\text{ss}}$), con 18% de ST_i y pH_i de 6.65. Esto se puede observar en la tabla 38. El pH no fue intervenido a lo largo de la operación de los reactores. En las figuras D1-13 (anexo D) se muestran los resultados de la producción acumulada de hidrógeno de los diferentes tratamientos a lo largo del tiempo. Cada ciclo de producción de hidrógeno se representa con una "C". Cada ciclo inicia cuando se gasea con N_2 cada reactor, los puntos en cada ciclo representa el monitoreo donde solo se realiza el venteo. Se obtuvieron 5 ciclos de producción de hidrógeno (tabla 38).

En la figura 28a, b y c se representa el efecto de los ST y pH sobre la producción de hidrógeno, esto con la finalidad de observar las tendencias que ofrecen los factores. La máxima producción de hidrógeno se observa a 18% de ST_i y pH_i de 6.65, como se menciona antes, y disminuye esta producción conforme aumenta la cantidad de ST. Esto puede deberse a una posible presión osmótica mátrica sobre los microorganismos (Escamilla-Alvarado *et al.*, 2013; Robledo-Narváez *et al.*, 2013).

En la tabla 39 se muestran los valores promedios de la producción acumulada de hidrógeno agrupado por efecto del factor ST. Se puede observar y se confirma que la mayor producción acumulada de hidrógeno es con 18% de ST.

Tabla 38. Producción acumulada en cada ciclo de producción de hidrógeno

T	STi	pHi	P _{H₂,cum} por ciclo de incubación					Total	Total	Final Σ AOV	Final Σ Solv	ρ Final	Final	Final
			(mmol/gss)					Σ P _{H₂}	Σ P _{CH₄}			Σ VOA	A	pH
			(%)	C1	C2	C3	C4	C5	(mmol/g _{ss})	(mmol/g _{ss})	(mgDQO/Kgss)	(mgDQO/Kgss)	(-)	B
1	18	6.65	1.30	1.17	0.31	0.19	0.06	3.03	0.00	38444	624	62	2.08	5.54
2	32	6.65	0.51	0.48	0.17	0.27	0.09	1.51	0.00	16118	3429	5	1.47	5.60
3	18	7.35	0.98	0.81	0.16	0.15	0.35	2.45	0.00	21404	8.5	2518	1.86	6.39
4	32	7.35	0.27	0.11	0.02	0.02	0.02	0.45	0.00	19539	4.8	4071	1.80	6.19
5	15	7.00	1.04	0.55	0.05	0.03	0.00	1.66	3.02	13259	1.0	13259	4.80	6.99
6	35	7.00	0.22	0.53	0.12	0.21	0.03	1.11	0.03	11667	101	116	2.75	6.01
7	25	6.50	0.54	0.47	0.06	0.21	0.16	1.45	0.00	13210	590	22	1.74	5.57
8	25	7.50	0.55	0.37	0.04	0.14	0.11	1.21	0.00	16020	6.1	2626	2.25	5.81
9	25	7.00	0.57	0.46	0.19	0.16	0.07	1.45	0.00	31381	93	339	1.29	5.67
10	25	7.00	0.72	0.57	0.21	0.22	0.11	1.83	0.00	35834	1252	29	1.51	5.50
11	25	7.00	0.39	0.32	0.08	0.02	0.02	0.82	0.61	8283	6.1	1358	1.32	6.80
12	25	7.00	0.69	0.86	0.28	0.24	0.10	2.17	0.00	25960	422	62	1.40	5.60
13	25	7.00	0.79	0.56	0.20	0.16	0.09	1.81	0.00	40852	980	42	1.24	5.62



$$P_{H_2,cum} \text{ (mmol } H_2/g_{ds}) = 1.62 - 0.54*x_1 - 0.25*x_2 + 0.010*x_1^2 - 0.017*x_2^2 + -0.12*x_1*x_2$$

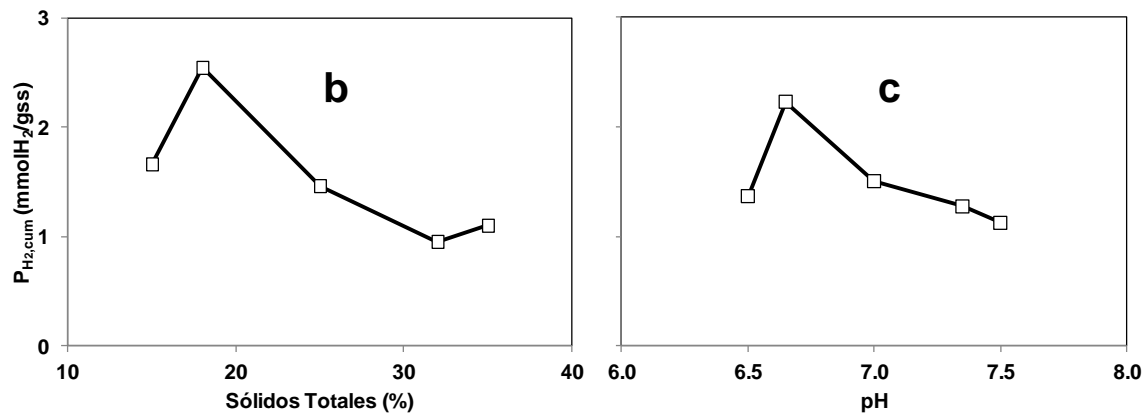


Figura 28. (a) Superficie de respuesta de producción acumulada de hidrógeno; (b) Efecto de los sólidos totales; (c) pH inicial sobre la producción acumulada de H_2 .

Tabla 39. Efecto principal de ST sobre $P_{H_2,cum}$ (mmol/reactor)

msh (g)	ST (%)	$P_{H_2,cum}$ (mmol/react)	mss (g)	$P_{H_2,cum}$ (mmol/g sustrato seco)
32	15	7.98	4.80	1.66
32	18	15.78	5.76	2.74
32	25	12.28	8.00	1.53
32	32	10.04	10.24	0.98
32	35	12.42	11.20	1.11

En la tabla 40, se muestran los valores promedios de la producción de hidrógeno para el factor pH. Se aprecia una tendencia donde la mayor producción acumulada de hidrógeno fue a pH inicial de 6.65.

Tabla 40. Efecto principal de pH sobre $P_{H_2,cum}$ (mmol/reactor)

msh (g)	pH	$P_{H_2,cum}$ (mmol/react)	mss (g)	$P_{H_2,cum}$ (mmol/g sustrato seco)
32	6.50	11.58	NA	1.45
32	6.65	16.49	NA	2.27
32	7.00	12.15	NA	1.55
32	7.35	9.33	NA	1.45
32	7.50	9.68	NA	1.21

El pH es un factor que tiene varios efectos fisiológicos en los microorganismos, por ejemplo, los efectos del pH sobre la carga eléctrica de las membranas celulares, que a su vez puede influir en la asimilación de sustratos y nutrientes. Asimismo, el pH puede tener un efecto notable en actividades enzimáticas. Se sabe que el pH puede determinar en gran medida el tipo y la distribución de productos de fermentación. En la producción de biohidrógeno, el pH influye fuertemente en la actividad bacteriana, afectando la producción global

de hidrógeno, la velocidad específica de generación y el tipo y concentración de los ácidos orgánicos y disolventes (Li *et al.*, 2007).

Se sabe que el pH inicial en procesos en lote tiene una influencia sobre la actividad de la hidrogenasa, y por ende en la producción de hidrógeno; la hidrogenasa es una enzima clave en la producción de hidrógeno por especies de *Clostridium* y por bacterias entéricas como *E. coli*, (Levin *et al.*, 2009; Quéméneur *et al.*, 2010). Las hidrogenasas pueden ser expresadas a pH 6.5 (Demuez *et al.*, 2007), por lo tanto era de esperar que a pH inicial de 6.65 en nuestro sistema en lote se mantuviera un intervalo de pH favorable para la producción de hidrógeno.

Los datos de la sumatoria de la producción acumulada de hidrógeno en cada ciclo se analizaron con el programa Design-Expert 6.0.0. y se obtuvo la superficie de respuesta que se muestra en la figura 28a, donde la ecuación está en términos de las variables codificadas.

La ecuación de la superficie de respuesta de $P_{H_2,cum}$ fue:

$$P_{H_2,cum} \left(\frac{mmolH_2}{g_{SS}} \right) = 1.62 - 0.54 * X_1 - 0.25 * X_2 + 0.010 * X_1^2 - 0.017X_2^2 - 0.012X_1 * X_2 \quad [21]$$

donde:

$P_{H_2,cum}$ = producción acumulada de hidrógeno (mmol/gss)

X_1 = concentración codificada de ST

X_2 = valor codificado de pH

La codificación de las variables se muestra a continuación:

$$ST = 25 + (X_1/0.14142) \quad [22]$$

$$pH = 7.00 + (X_2/2.8284) \quad [23]$$

Intervalo de variación

$$15 \leq ST \leq 25; -1.4142 \leq X_1 \leq +1.4142 \quad [24]$$

$$6.5 \leq pH \leq 7.5; -1.4142 \leq X_2 \leq +1.4142 \quad [25]$$

La superficie de respuesta de $P_{H_2,cum}$ indica claramente un máximo de producción en la zona de $ST_i = 19.5\%$ y $pH_i = 6.5$.

En la figura 29a, se observa la producción de ácidos orgánicos volátiles (AOV) en la FASSH-VI, donde se favoreció la producción de ácidos orgánicos volátiles en las unidades experimentales con menor cantidad de sólidos totales. Esto es coherente con los resultados de producción de hidrógeno obtenida en la FASSH-VI, ya que es parte del metabolismo esperado con respecto a la producción de hidrógeno.

Además, la forma de la superficie de respuesta de la producción acumulada de hidrógeno apoya la forma de la superficie de AOV en la faja de pH's entre 6.50-6.75. Efectivamente AOV muestra un máximo en la cercanía de 20% de ST y 6.50 de pH, lo que es congruente con la $P_{H_2,cum}$ máxima correspondiente a 18%ST y 6.65 de pH.

La ecuación de la superficie de respuesta de AOV fue:

$$AOV \left(\frac{mgDQO}{Kgss} \right) = 28462.00 - 3305.30 * X_1 - 1205.63 * X_2 + 5115.25X_1 * X_2 - 5415.19 * X_1^2 - 4339.19 * X_2^2 \quad [26]$$

donde:

AOV = concentración de ácidos orgánicos volátiles en mgDQO/Kgss

X_1 = concentración codificada de ST

X_2 = valor codificado de pH

La figura 29b muestra la superficie de respuesta correspondiente a la producción de solventes. Se puede observar que a mayor cantidad de sólidos totales iniciales se favorece la solventogénesis, que es un sumidero de hidrógeno, las reacciones involucradas requieren de dos deshidrogenasas para lograr las reducciones necesarias para la producción del etanol y butanol. Dado que la producción de solventes implica reducciones, la ferredoxina es incapaz de transferir electrones a la hidrogenasa para la generación de hidrógeno (Valdez-Vázquez y Poggi-Varaldo, 2009).

Estos resultados son coherentes con la baja producción acumulada de hidrógeno a altos contenidos de ST, como se observa en la figura 28a.

La superficie de respuesta de solventes está dada por la ecuación [27]:

$$\text{Solv} = 578.27 + 367.84 * X_1 - 608.18 * X_2 - 702.18 * X_1 * X_2 \quad [27]$$

donde:

Solv = concentración de solventes en gDQO/Kgss

X_1 = concentración codificada de ST

X_2 = valor codificado de pH

La superficie de respuesta que representa la relación entre los ácidos orgánicos y los solventes (ρ , figura 29c) tiene su valor más alto a bajo contenido de ST lo cual es congruente tanto con la superficie de respuesta de AOV y la de solventes. Por ejemplo a altos ST se tiene baja producción de AOV y altas producciones de solventes, se espera que a bajos valores de ρ ($\sum \text{AOV} / \sum \text{Solv}$) la producción de hidrógeno sea baja ya que representa mayor producción de solventes y por lo tanto un sumidero de hidrógeno. Escamilla-Alvarado *et al.*, (2013) encontraron que a 21% de ST prevalece la acidogénesis sobre la solventogénesis, sin embargo a 35% de ST el valor de ρ es menor y el metabolismo se inclina a la solventogenesis. Esto probablemente por efecto de osmosis mátrica causada por efecto de altos contenidos de ST.

La ecuación de la superficie de respuesta de la relación AOV/Solv fue:

$$\rho = 366.00 - 2136.38 * X_1 + 1275.58 * X_2 + 402.50 X_1 * X_2 + 25575.31 * X_1^2 - 106.44 * X_2^2 \quad [28]$$

donde:

ρ = relación entre $\sum \text{AOV}$ y $\sum \text{Solv}$

X_1 = concentración codificada de ST

X_2 = valor codificado de pH

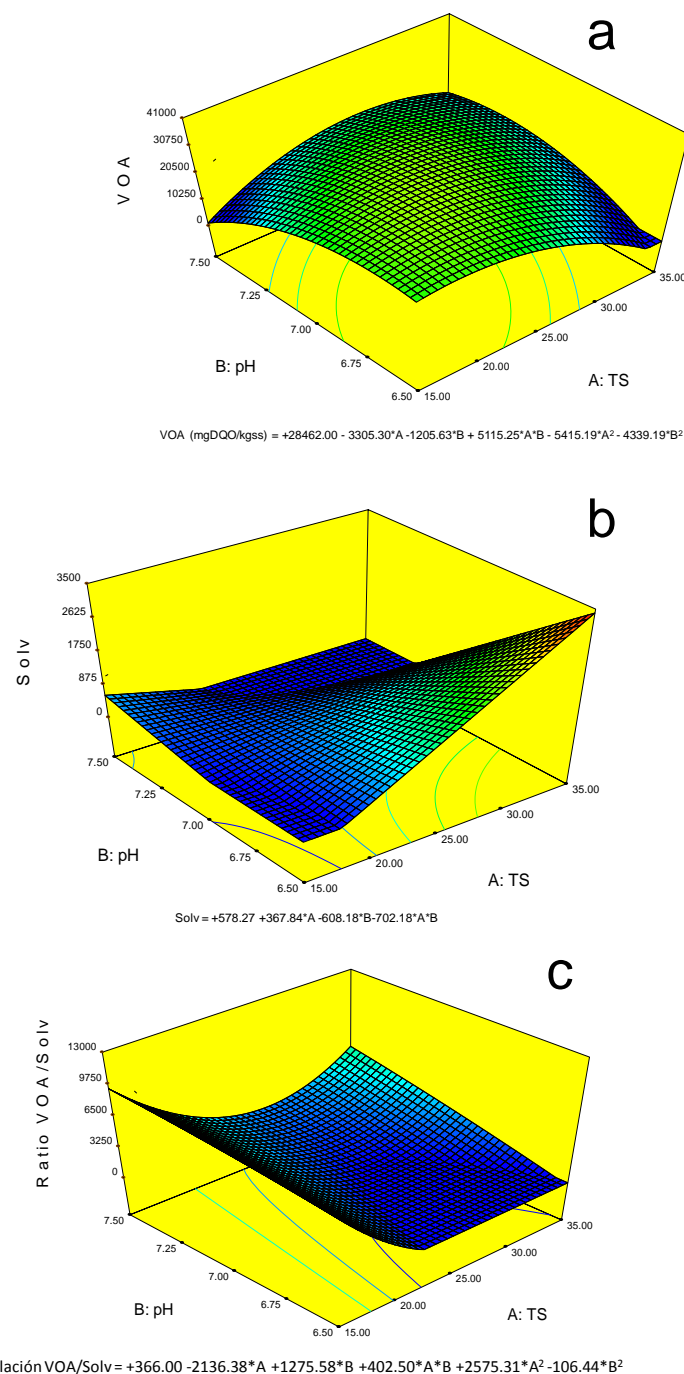


Figura 29. (a) Superficie de respuesta de la concentración de ácidos orgánicos volátiles. (b) Superficie de respuesta de la concentración de solventes generados. (c) Superficie de respuesta de la relación de AOV/Solv; (las ecuaciones están en términos de las variables codificadas).

En la figura 30a se representa la superficie de respuesta de la variable pH final. Puede verse una depresión en el valor de pH final para ST intermedios y altos, lo que es congruente con la mayor producción de solventes en figura 29b puesto que hay información experimental que ligando bajos valores de pH en fermentaciones solventogénicas (Valdez-Vázquez y Poggi-Varaldo, 2009; Escamilla-Alvarado *et al.*, 2013; Muñoz-Páez *et al.*, 2013). Como se discutió anteriormente, la solventogénesis es un sumidero de hidrógeno por lo cual con bajos pH finales se espera baja producción de H₂ (figura 30a), que se confirma en nuestro experimento.

La ecuación de la superficie de respuesta de pH final fue:

$$pH_{final} = 5.84 - 0.19 * X_1 + 0.22 * X_2 - 0.065 * X_1 * X_2 + 0.29 * X_1^2 - 0.12 * X_2^2 \quad [29]$$

donde:

pH_{final} = valor de pH final

X₁ = concentración codificada de ST

X₂ = valor codificado de pH

En cuanto a la variable ΔpH, altos valores de ΔpH estarían asociados a los más bajos valores de pH final. Por tanto, es esperable que las correspondientes superficies de respuesta sean un espejo aproximado una de otra. Esto ocurre en nuestro trabajo (figura 30 a y b) lo que refuerza la congruencia de los resultados experimentales.

La ecuación de la superficie de respuesta de ΔpH fue:

$$\Delta pH = 1.16 + 0.19 * X_1 + 0.13 * X_2 + 0.065 * X_1 * X_2 - 0.29 * X_1^2 + 0.12 * X_2^2 \quad [30]$$

donde:

ΔpH = diferencia entre pH inicial y pH final

X₁ = concentración codificada de ST

X₂ = valor codificado de pH

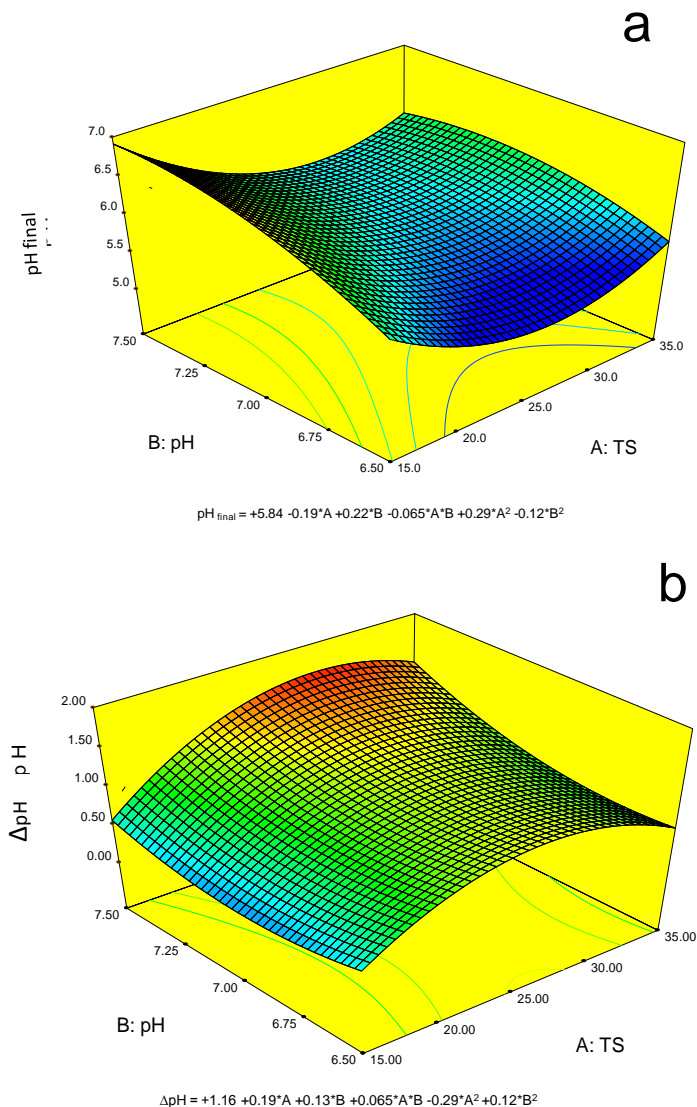


Figura 30. (a) Superficie de respuesta del pH final. (b) Superficie de respuesta de ΔpH (las ecuaciones están en términos de las variables codificadas).

Se sabe que a bajo pH se favorece la inhibición de la metanogesis por lo que en principio conviene mantener pH bajo para la producción de hidrógeno (Wu *et al.*, 2010, Muñoz-Páez *et al.*, 2012). Nuestros resultados experimentales muestran que a pH neutro y ligeramente básico hay presencia de metano (figura 31a).

La aparición de metano no es instantánea, típicamente el metano aparece en el tercer ciclo de los 5 ciclos de incubación repetida. Probablemente el intervalo óptimo de pH para la producción de hidrógeno tarda en alcanzarse en las unidades experimentales.

La ecuación de la superficie de respuesta de $P_{CH_4,cum}$ fue:

$$P_{CH_4,cum} = 0.12 - 0.53 * X_1 + 0.000 * X_2 + 0.000 * X_1 * X_2 + 0.51 * X_1^2 - 0.25 * X_2^2 \quad [31]$$

donde:

$P_{CH_4,cum}$ = producción acumulada de metano mmol/gss

X_1 = concentración codificada de ST

X_2 = valor codificado de pH

En la figura 31b se observa la relación A/B ([ácido acético]/[ácido butírico], ambas en g DQO/Kgss) . En todos los tratamientos la vía metabólica favorecida fue la del ácido acético (tabla 38), esta relación ha sido utilizado por otros investigadores en el estudio del rendimiento de la fermentación hidrogenogénica (Kim *et al.*, 2006; Valdez-Vázquez *et al.*, 2006, Muñoz-Páez *et al.*, 2013). Se trata de un parámetro que puede indicar la ruta metabólica favorecida en el proceso fermentativo. Los valores límite de la relación A/B expresados en unidades de DQO equivalente es la siguiente:

$$\text{Si } (A/B)_{DQO} > 0.79, H_2 \text{ via HAc es predominante} \quad [32]$$

$$\text{Si } (A/B)_{DQO} < 0.79, H_2 \text{ via HBU es predominante} \quad [33]$$

La ecuación de la superficie de respuesta de la relación A/B fue:

$$A/B = 1.35 - 0.45 * X_1 + 0.10 * X_2 + 0.14 * X_1 * X_2 + 0.94 * X_1^2 + 0.051 * X_2^2 \quad [34]$$

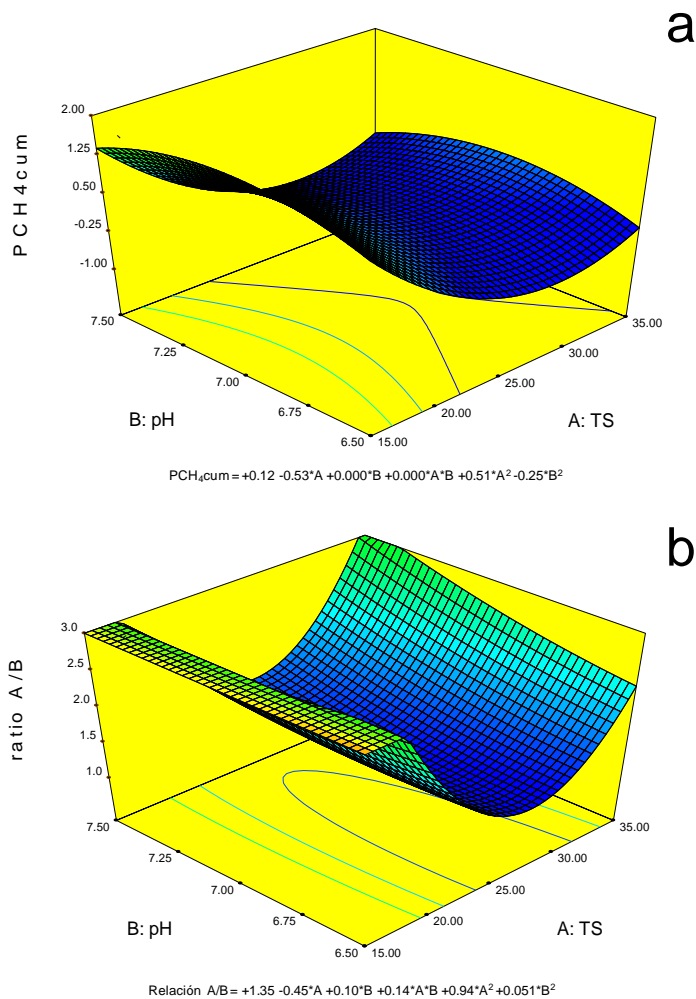


Figura 31. (a) Superficie de respuesta de producción acumulada de metano; (b) superficie de respuesta de la relación de A/B (las ecuaciones están en términos de las variables codificadas).

donde:

A/B = relación la producción de ácido acético y ácido butírico

X_1 = concentración codificada de ST

X_2 = valor codificado de pH

A continuación se presenta la relación de producción de hidrógeno con la actividad de agua y el potencial de agua en función de la cantidad de sólidos totales iniciales presente en la alimentación (figura 32).

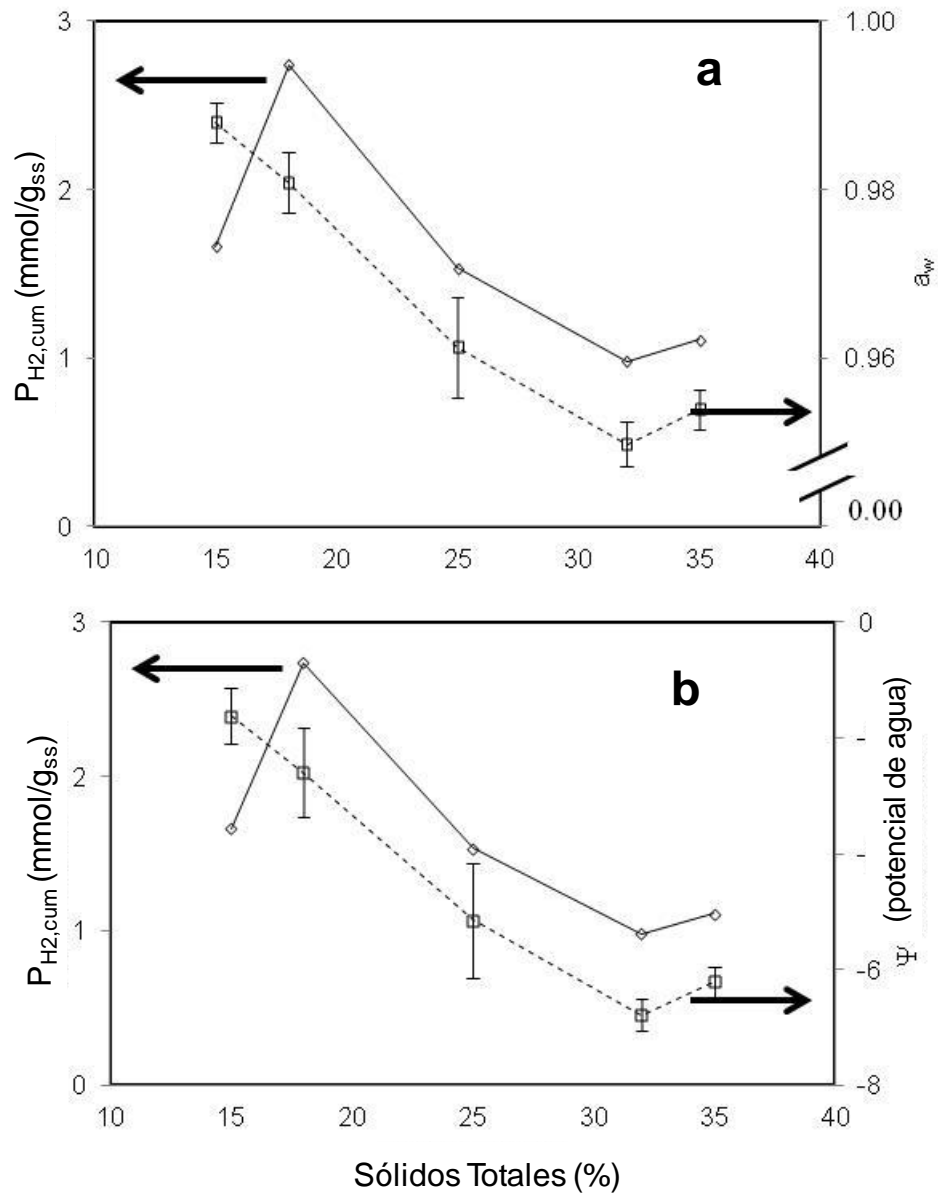


Figura 32. Relación de la producción de hidrógeno con la actividad de agua y el potencial de agua en función de los sólidos totales en la alimentación

La figura 33 muestra la relación que existe entre la producción acumulada de hidrógeno con la conductividad eléctrica. Se observaron cinco ciclos de producción de H_2 (tabla 38). El primer ciclo de generación de H_2 dio la más alta producción de hidrógeno por ciclo en todos los casos. La máxima producción de H_2 acumulada correspondía al tratamiento con ST inicial de 18%. La figura 28a muestra la superficie de respuesta de la producción acumulativa de H_2 . Refleja la máxima generación de hidrógeno a 18% ST y la disminución con el aumento de ST. Por otra parte, el pH inicial de 6,65 favorece la producción de H_2 (Tratamientos 1 y 2, tabla 38). La ecuación que se ajustaba a la superficie de respuesta es la ecuación [21]. De acuerdo a la ecuación 21, encontramos que la producción máxima prevista de hidrógeno fue de 2,6 mmol H_2/g_{ds} en 19.5% de sólidos totales inicial y un pH inicial de 6,5. Esta máxima predicha cae cerca de los resultados y las condiciones del tratamiento 1 (tabla 38).

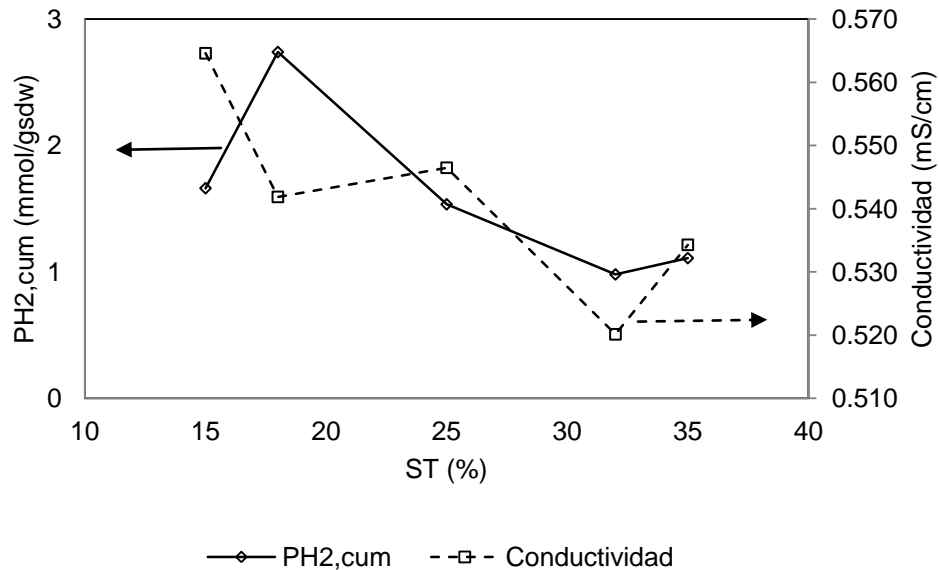


Figura 33. Relación de la producción de hidrógeno y la conductividad eléctrica en función de los sólidos totales en la alimentación

Se implementó una corrida experimental de FASSH-VI para el punto predicho (19,5% TS inicial, 6,5 pH inicial) por triplicado. El hidrógeno producido fue de 1.20 ± 0.009 para el ciclo 1, 1.15 ± 0.24 para el ciclo 2, 0.6 ± 0.007 para el ciclo 3, 0.30 ± 0.09 para el ciclo 4 y 0.05 ± 0.04 para el ciclo 5. El pseudorendimiento de hidrógeno en la corrida de verificación ascendió a 3.1 ± 0.04 mmol H₂/g_{ds}, ligeramente más altos que el valor en el tratamiento 1 (tabla 38) y 20% mayor que el máximo previsto de la superficie de respuesta. A pesar de las diferencias cuantitativas, la producción obtenida se convirtió en un máximo experimental que coincide cualitativamente con la tendencia representada y predicho por la superficie de respuesta.

La figura 32a representa una estrecha relación entre la disminución de la actividad tanto a_w agua y potencial \square agua con aumento de ST inicial (excepto para el tratamiento con 15% de ST, en el que se observó la desviación de hidrogenogénesis a la fermentación metanogénicas, dando así resultados bajos de producción de hidrógeno acumulado a baja nivel de ST. En nuestro caso, el estrés osmótico y probablemente la menor actividad de agua (Brown, 1976) pudieron ser factores que propiciaron una menor producción de hidrógeno en tratamientos con altos ST inicial.

La a_w y el potencial de agua de la FORSA en este trabajo fueron bajos en altos ST inicial ($a_w = 0,94-0,95$, $\square = -7$ MPa; figura 32), La a_w más baja de nuestro trabajo fue inferior al umbral común de $a_w = 0,98$ para el metabolismo microbiano como se detalla en la introducción. Sólo como comparación, las actividades de agua en pan y agua de mar son 0,95 y 0,98, respectivamente (Prescott *et al.*, 1999). Por lo tanto, es probable que el metabolismo de la mayoría de las bacterias fermentativas en nuestros tratamientos en ST inicial alta se vio afectada negativamente por la baja disponibilidad de agua (Madigan *et al.*, 2009; Csonka 1989) lo que contribuye a disminuir la producción de biohidrógeno correspondiente (tabla 38, tratamientos 4 y 6).

El tratamiento 5 con 15% de sólidos totales inicial y de pH inicial 7,0 tenía la menor cantidad de hidrógeno. Una desviación metanogénesis inesperada de la fermentación (figura C5, anexo C) se inició en el tercer ciclo de producción de H₂,

esta desviación puede ser debido a que el pH inicial de 7,0 se mantuvo casi constante a lo largo de la fermentación (pH final 6,99, tabla 38). Este valor neutro del pH puede haber permitido un resurgimiento de metanógenos en el cultivo por lote (figura 31a, Madigan *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2008). El acetileno que es un inhibidor de la metanogénesis, se inyectó al inicio del primer ciclo. Es probable que el acetileno fuera eliminado del espacio gaseoso del minirreactor, con la primera formación de biogas, por lo que en el tercer ciclo de producción de hidrógeno, el minirreactor no contaba con acetileno como inhibidor de metano.

Es probable que una producción máxima de hidrógeno se hubiera obtenido con el tratamiento 5 (tabla 38). En efecto, si tomamos en cuenta el H₂ equivalente a metano producido, P_{H₂} equivalente a CH₄ más el H₂ producido en los ciclos 1 al 3 (1,64 H₂/g_{ss} mmol), la producción total posible de H₂ habría alcanzado un valor de 4,40 mmol/g_{ss}. El P_{H₂} equivalente a CH₄ se calcula de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
 P_{H_2 \text{ equiv } CH_4} \text{ (mmolH}_2\text{/g}_{ss}) &= \\
 P_{CH_4} \text{ (mmolCH}_4\text{/g}_{ss}) * 4 \text{ (mmolCH}_4\text{/mmolH}_2) * 0,30 * 0,80 &= \\
 3,02 * 4 * 0,30 * 0,80 &= 2,74 \text{ (mmolH}_2\text{/g}_{ss}) \quad [35]
 \end{aligned}$$

donde el factor de 4 (mmolCH₄/mmolH₂) se basa en la metanogénesis hidrogenotróficas (4H₂ + CO₂ → CH₄ + 2H₂O), el factor 0.30 se tiene en cuenta que en el tratamiento de residuos 70% de metano se genera a través de la vía acetoclastica mientras que el 30% se produce por vía propionato-hidrógeno en la metanogénesis de los desechos (Metcalf y Eddy, 2002), y el factor de 0.80 corresponde a la inhibición de hidronogénesis por la acumulación de ácidos orgánicos en los sólidos (Muñoz Páez *et al.*, 2012).

Como hemos mencionado anteriormente, la relación de los ácidos acético butírico (A/B) es un indicador de la predominancia de las rutas metabólicas productoras de hidrógeno simples en la fermentación. En general, todos los tratamientos mostraron proporciones A/B superiores a 0.79 (tabla 38) que sugiere un predominio de la ruta del ácido acético en la fermentación hidrogenogénica (figura 31b). Además, se obtuvo una relación A/B de 2.1 para el tratamiento 1, la

corrida con máxima producción de hidrógeno 3,03 mmol H₂/gds, lo que indica una consistencia de resultados.

Valdez-Vázquez *et al.* (2006b), también reportaron una fuerte correlación positiva entre la mayor P_{H₂,cum} y alta A/B en la FASSH-VI de FORSM. Su mayor producción de H₂ fue de 1.5 mmolH₂/g_{ss} el cual se asoció a un valor de A/B=4,45> 0.79 (tabla 38). Kim *et al.* (2006), obtuvieron 1,68 molH₂/mol hexosa con una A/B=0,12 en una fermentación sumergida de sacarosa (20 gDQO/L) en un CSTR de 5 L. Sus resultados sugieren un cambio de ruta hacia el ácido butírico donde se producen 2 moles H₂/mol hexosa, mientras que la ruta del ácido acético tiene un rendimiento típico de 4 moles H₂/mol hexosa. Este último se puede producir cuando la fermentación se lleva a cabo por los microorganismos anaerobios tales como clostridios, en particular con la presencia de *Clostridium pasterianum* (Chen *et al.*, 2001).

Chang y Lin (2004) reportaron un valor de A/B=0.57, con una productividad de hidrógeno de 1.5 mmolH₂/mol sacarosa. Sus resultados bajos podrían ser atribuidos a predominio de la fermentación de butirato (obtuvieron concentraciones altas de butirato) y cepas de *Clostridium* dominantes en su reactor. En contraste, Ueno *et al.* (2007b), observaron una relación inversa entre la relación A/B y la producción de hidrógeno: una relación más baja de A/B, se asoció a un aumento de la producción de hidrógeno en fermentación sumergida continua de lechada de basura artificial con 7% ST. Por ejemplo, una producción de 0.96 mmol H₂/g_{ss} correspondió a A/B=1,34; por otro lado, un pseudorendimiento de H₂ de 2.08 mmolH₂/g_{ss} correspondió a A/B=0.23. Este patrón no se discutió ni se explica por los autores.

7.4. Resultados de la actividad 4. Realizar balance energético de DASSA-M y DASSA-T.

Se realizó un balance de energía con datos experimentales de un trabajo previo de nuestro grupo de trabajo (Valdez-Vázquez *et al.*, 2006; anexo F3), donde se utilizaron digestores anaerobios acidogénicos (DASSA) con volumen de 1 L para la producción de hidrógeno a régimen mesofílico (RM, 35°C) y régimen termofílico (RT, 55°C). El sustrato para los DASSA fue la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU).

Por otro lado, se realizó el balance energético para los resultados obtenidos en DASSA-M y DASSA-T en esta tesis, para comprobar la superioridad de la hidrogenogénesis termofílica sobre el proceso mesofílico. Se utilizó la ecuación 13. Los excedentes netos de producción de hidrógeno (termofilia vs mesofilia) y sus correspondientes valores energéticos se compararon con las pérdidas por calefacción y las pérdidas de energía al ambiente tomando en cuenta el volumen de hidrógeno producido, el flujo másico alimentado a los DASSA, el área de transferencia de calor de los DASSA y la conductividad térmica del aislante (fibra de vidrio).

Finalmente se efectuó el balance energético para la FASSH-VI, donde se comparó la energía obtenida por generación de H₂ con los insumos de energía debidos a calefacciones varias y energías de bombeo y mezclado. Se observa que la energía requerida (1.86×10^{11} J) es mayor que la energía que aporta la combustión del hidrógeno producido (1.32×10^{11} J), el resumen de balance de energía se muestra en la tabla 44. El balance detallado se encuentra en el anexo F8.

Por otro lado, se realizó el balance energético para la DASSA-M (balance detallado en anexo F9) y se encontró que la energía requerida para el proceso mesofílico ($E_{requerida} = 3.61 \times 10^{10} J$) es mucho mayor que la obtenida por el hidrógeno producido ($E_{H_2} = 1.42 \times 10^7 J$).

Se uso el valor de C_p de la FORSU como si fuera el C_p de la FORSA (ecuación 13, anexo F3), este valor se obtuvo promediando los C_p de algunos componentes de la FORSU, como se muestra en la tabla 41.

La alimentación de los DASS tuvo 35% de sólidos totales. El C_p promedio representa el C_p de los sólidos totales, por lo que el valor final se ve afectado por el C_p del agua, que representa el 65% restante de la alimentación (FA). El valor final a utilizar es entonces $C_p=3.009$ kJ/Kg°C. La tabla 41 muestra todas las propiedades térmicas utilizadas en el balance. La tabla 42 muestra la totalidad de las consideraciones para el escalamiento de los resultados experimentales a nivel laboratorio a un nivel planta piloto. Se tomaron los resultados de 13d de tiempo de residencia másico (TRM), mientras que el volumen másico de operación se vio afectado por el volumen de escalamiento, que fue de 1 L a 1000 m³. Para el diseño del reactor se tomó una L/D igual a 3, por lo que el área total de transferencia superficial es de 576.6 m².

Tabla 41. Capacidades caloríficas de componentes de la FORSU (Badui, 2006) y propiedades térmicas de los elementos involucrados en el balance térmico

Sustratos	C_p^a (kJ/Kg°C)
Espárragos	3.940
apio	3.980
rábano	3.270
patatas	3.430
naranja	3.770
C_p promedio	3.762
$C_{p,FORSA}^b$	3.009
C_{p,H_2O}	4.184
ΔH_{CH_2}	-241.6 KJ/mol

Notas: ^aCapacidad calorífica reportada en literatura, ^bse calcula considerando 80% de humedad.

Las características del aislante de fibra de vidrio propuesto fueron: un coeficiente de conductividad térmica (K) de 4.18 kJ/m²°Cd y un espesor de 0.025m.

En la primera mitad de la tabla 43, se muestran los resultados obtenidos en régimen mesofílico (RM) y régimen termofílico (RT). La parte complementaria de esta misma tabla son los resultados producto del balance. La energía derivada por la combustión del hidrógeno (E) en RT fue cero, ya que no fue posible medir la producción de biogás, la E debida al RM fue de -0.012 KJ/d para todo el proceso y de -0.093 KJ/d para el periodo de mejor desempeño. La comparación energética entre RT y RM (ΔE) representa la ganancia energética obtenida bajo RT, bajo las condiciones de este experimento no hubo ganancia alguna, $\Delta E = 0.002$ KJ/d para todo el periodo de operación y de 0.093 KJ/d para el periodo de mejor desempeño, comparado con el producto de la ecuación 14 ($NetQ_{heating}$) resulta aproximadamente 85% menor. Con esto queda demostrado, que bajo las consideraciones hechas, y con los valores reportados obtenidos en este trabajo, la termofilia resulta ser no ser provechosa en comparación con la mesofilia, por lo que no vale el gasto energético que requiere.

Tabla 42. Consideraciones de diseño y escalamiento, Poggi-Varaldo (2008) comunicación personal (Perry, 1992)

Parámetro	Valor
B_m	11 g SV/Kg _{bh} /d
M_r	1x10 ⁶ Kg sólidos húmedos
TRM	21 d
T_{ref}	15 °C
m_a	47619 Kg _{bh} /d
$V_{diseño}$	1000 m ³
Relación L/D	3
D	7.52 m
L	22.55 m
Área superficial	576.62 m ²
k	3.438 KJ/m K d
e	0.025 m
$\Delta \hat{H}_{comb}$	286 KJ/mol
C_p	4.4 KJ/Kg _{bh} K

Tabla 43. Balance de energía para DASSA-M vs DASSA-T (datos de esta tesis)

DASSA	Régimen	
	T (55°C)	M (35°)
QH ₂ (NmL H ₂ /d)	0.0	1.1
%H ₂ en biogás	6.0	0.83
^a m _{H₂} , (mgH ₂ /d)	0.0	0.098
^b E (KJ/d)	0.0	-0.012
^c T/M		0.0
^d ΔE (KJ/d)	0.012	
^e Calor neto transferido (KJ/d)	0.002	
Periodo de mejor desempeño		
QH ₂ (NmL H ₂ /d)	0.0	8.6
%H ₂ en biogás	6.0	14.0
^a m _{H₂} , (mgH ₂ /d)	0.0	0.768
^b E (KJ/d)	0.0	-0.093
^c T/M		0.0
^d ΔE (KJ/d)	0.093	
^e Calor neto transferido (KJ/d)	0.017	

Notas. T: termofilia, M: mesofilia^a: masa de H₂ producido, ^b: energía derivada por la combustión del hidrógeno producido, ^c: relación de H₂ producción en termofilia y mesofilia, ^d: diferencia energética entre regímenes termofílico y mesofílico, ^e: Net Q_{heating} de la ec.14.

Tabla 44. Balance de energía para FASSHVI y DASSA-M

FASSH-VI	Energía (J)
$\Delta H_{calentamiento}^{FORSA}$ $T_{amb} \rightarrow T_r$	9.03x10 ¹⁰
$\Delta H_{calentamiento}^{reactor}$ $T_{amb} \rightarrow T_r$	2.05x10 ⁹
Q calefacción para mantener a T _r	6.56x10 ¹⁰
E _{mezclado}	2.5x10 ¹⁰
E _{requerida}	1.86x10 ¹¹
E _{H₂}	1.32x10 ¹¹
DASSA-M	Energía (J)
$\Delta H_{calentamiento}^{FORSA}$ $T_{amb} \rightarrow T_r$	3.00x10 ¹⁰
E _{mezclado}	6.05x10 ⁹
E _{requerida}	3.61x10 ¹⁰
E _{H₂}	1.42x10 ⁷

7.5. Resultados de la actividad 5. Desarrollo y preservación de cultivo fotoheterótrofo hidrogenogénico.

El medio de la columna se coloreó de púrpura (Figura 34), esto indicó que las BPNA se estaban desarrollando. Se tomó de la sección púrpura de la columna Winogradsky y de la interface entre el líquido y el sedimentado una alícuota de 10 mL y se inocularon botellas serológicas (figura 35), 60 mL de volumen total con un volumen de operación de 40 mL, con medio Pfennig con ácido acético como fuente de carbono a una concentración de 40mM.

La coloración y la producción de hidrógeno se monitoreó en este primer pase y se realizó un 2do pase cuando se observó coloración. Las botellas serológicas se incubaron a 30°C con una fuente de luz artificial, empleando una lámpara de tungsteno de 100W que proporcionó una intensidad luminosa de 3 Klx.

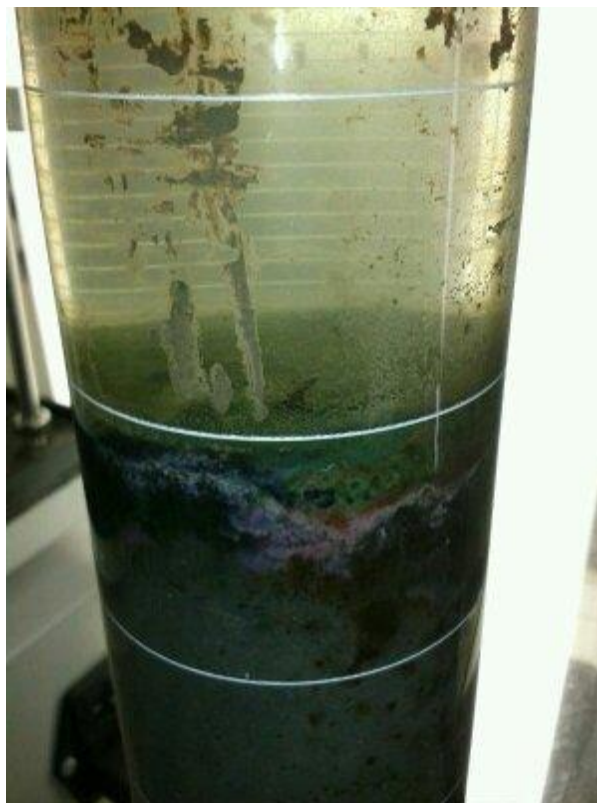


Figura 34. Presencia de BPNS en la columna Winogradsky



Figura 35. Botellas serológicas inoculadas con BPNS

A continuación se presenta la producción de hidrógeno del primer y segundo pase del cultivo mixto obtenido (figura 36).

La alimentación semanal fue con un TRH=21d con pH de 7.0 ± 0.2 . Se midió el pH final en cada resiembra y este subió hasta valores de 10.01, como consecuencia del consumo del sustrato. Se mantuvo la alimentación de las BPNS y cuando no se restablecía la producción de hidrógeno se procedía a las resiembras, estas acciones se realizaron hasta la utilización de las BPNS en la fotofermentación del extracto de los sólidos gastados.

No se implementó un método de conservación para las BPNS, por lo que el método para no perder el cultivo mixto fue el mantenimiento continuo del mismo, tal como se describió en el párrafo anterior.

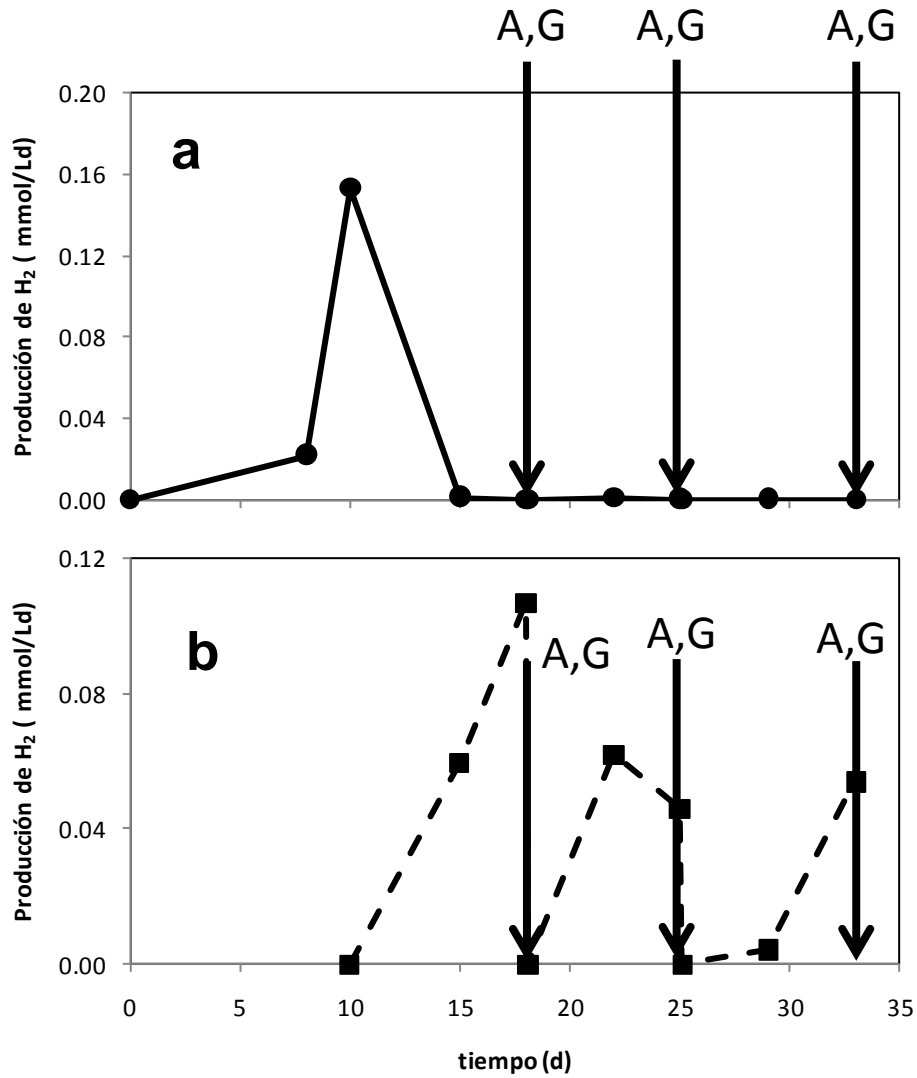


Figura 36. Procedimiento típico de mantenimiento de cultivos de BPNS, a) 1er. pase; b) 2do pase (A,G: alimentación y gaseo con argón)

7.6. Resultados de la actividad 6. Operación de fotobiorreactores en sistema en lote.

Los sólidos gastados se lavaron con agua destilada con una relación 1:3, se agitó vigorosamente y se filtró, dicho extracto se congeló hasta su uso.

La concentración de ácidos grasos y solventes se determinó por cromatografía de gases en la central analítica del DBB. En la tabla 45 se muestran los resultados en mg/Kg en base seca y en gDQO/Kg (la concentración todos los componentes se pasa a gDQO para poder sumarlos y comparar), esto en función del contenido en los DASSA-M pero también se muestran los resultados en gDQO/L_{ext}, esto para fines de la fotofermentación.

Con los extractos se realizó la fotofermentación usando un consorcio que se nombro G3 y como control a *Rhodopseudomonas palustris*. Se realizó una dilución 1:10 de los extractos de DASSA no esterilizados que se alimentaron en la etapa de fotofermentación, con un pH inicial de 5.84, iluminación continua a 3 Klux (se empleo una lámpara de tungsteno de 100W), en un sistema en lote. En la tabla 46 se muestran alimentaciones usadas en fotofermentación por diversos grupos de trabajo, que van desde 13-26 gDQO/L; cabe aclarar que en la mayoría de los casos, usan aguas sintéticas, mientras que el sustrato empleado en este trabajo es un extracto de una fermentación oscura previa.

Tabla 45. Concentración de metabolitos presentes en los sólidos gastados de DASSA-M y en extractos.

Especie	DASSA-1	DASSA-2	DASSA-3	DASSA-4	Promedio
EtOH	1269	832	0	0	525 ±274
HAc	87363	64954	44858	8120	51324 ±14562
HPr	49468	7948	3882	826	15531 ±9878
HBu	28914	20431	11708	2020	15768 ±5000
gDQO/Kg, bs					
EtOH	2.65	1.74	0.00	0.00	1.10 ±0.57
HAc	144.15	107.17	74.01	13.40	84.68 ±24.03
HPr	95.97	15.42	7.53	1.60	30.13 ±19.16
HBu	52.62	37.18	21.31	3.68	28.70 ±9.10
gDQO/L _{ext}					
EtOH	0.18	0.12	0.00	0.00	0.07 ±0.04
HAc	9.80	7.29	5.03	0.91	5.76 ±1.89
HPr	6.53	1.05	0.51	0.11	2.05 ±1.50
HBu	3.58	2.53	1.45	0.25	1.95 ±0.71

Se monitoreó la fotofermentación por 21 días, la producción de hidrógeno se presentó hasta el día 15. El pH al final de la fotofermentación fue de 9.46. La alimentación no se esterilizó y el pH final no fue ácido, sin embargo, no hubo presencia de metano (tabla 47), en contraste con lo que encontraron Acevedo-Benítez *et al.* (2008), donde se evaluaron, la iluminación continua e intermitente y dos niveles de concentración de extractos. Ellos encontraron una producción acumulada de metano de 5.39 mmolCH₄/L para uno de los consorcios utilizados, las unidades experimentales estuvieron sometidas a ciclos de luz/oscuridad (12-12 h), fueron alimentadas con el nivel alto de concentración de extractos (7.4 gDQO/L). Dichas unidades experimentales son las que presentaron una menor producción de hidrógeno y asumen que esto puede deberse a un desplazamiento de los microorganismos fotoheterótrofos por los microorganismos metanogénicos

presentes en los extractos, ya que al recibir mayor concentración de extractos recibieron una mayor concentración de microorganismos metanogénicos, por otro lado, también puede suponerse que en la fase de oscuridad los microorganismos fotoheterótrofos se vieron desfavorecidos en el metabolismo fotoheterótrofo y esto fue aprovechado por la comunidad metanogénica.

Tabla 46. Materia orgánica alimentada en fotofermentaciones con bacterias púrpura no del azufre en la literatura

Sustrato	Concetración (g/L)	DQO (g/L)	Σ [metabolitos] (gDQO/L)	Ref.
Acético	1.00	1.0650	12.58	Miyake <i>et al.</i> , 1984
Lactato	3.80	4.0497		
Butirato	4.10	7.4620		
Malato	7.00	5.0120	25.79	Tao <i>et al.</i> , 2008
Succinico	6.00	5.6904		
Acetato	2.00	2.1300		
Butirato	5.00	12.9555		
Succinato	3.50	3.3194	16.07	Li y Fang, 2008
Malato	7.00	5.0120		
Acetato	1.80	1.9170		
Butirato	3.20	5.8240		
Almidón	4.50			
Lactato	6.00	6.3942		Zhu <i>et al.</i> , 2007
Lactato	4.70	5.0088		Fascetti <i>et al.</i> , 1998
Acetato	2.80	2.9820	14.71	Takabatake <i>et al.</i> , 2004
Propionato	2.90	5.6260		
Butirato	1.90	3.4580		
Valerato	1.30	2.6476		
Láctico	15.30	16.3052		Fascetti y Todini, 1995
Etanol	0.04	0.07		Este trabajo
Ácido acético	3.49	5.76		
Ácido propiónico	1.06	2.05		
Ácido butírico	1.07	1.95		

Como puede verse en la tabla 47, los comportamientos de la cepa pura y del cultivo mixto son similares para las variables de respuesta más importantes, esto es, $P_{H_2, cum}$, $\eta_{H_2/sustrato}$, $\eta_{H_2/luz}$. Se encontraron diferencias en la remoción de materia orgánica como DQO, donde el consorcio G3 remueve significativamente más sin que se traduzca en producción adicional de H_2 . Esto podría deberse a que algunas cepas de G3 canalizan la materia orgánica a síntesis de biomasa o algún metabolismo fermentativo no hidrogenotrófico (Madigan *et al.*, 2009).

Tabla 47. Parámetros de desempeño en la fotofermentación extractos acidogénicos empleando bacterias púrpura no del azufre

Parámetro	Rp	G3
pH _{inicial}	5.84±0.57	5.84±0.71
pH _{final}	9.46±0.63	9.46±0.54
H ₂ (%)	14.37±11.20	12.96±10.75
CH ₄ (%)	ND ^a	ND
P _{H₂,cum} (mmol/L)	11.80±1.10	11.08±1.61
P _{CH₄,cum} (mmol/L)	---	---
Remoción de ácidos orgánicos ($\eta_{ac. org.}$, %)	44±23	86±18
Remoción de solventes ($\eta_{sol.}$, %)	ND	100
Remoción de DQO (η_{DQO} , %)	38±16	86±18
Eficiencia de conversión hidrógeno-sustrato ($\eta_{H_2/sustrato}$, %)	7.73±2.55	7.26±2.40
Eficiencia luminosa a 6 d ($\eta_{H_2/luz}$, %)	1.30±0.35	1.27±0.31
Eficiencia luminosa a 15 d ($\eta_{H_2/luz}$, %)	0.65±0.12	0.61±0.11

Notas: ^a no detectado; los resultados son al tiempo final de la fermentación

La eficiencia de conversión de luz se calculó con la ecuación 19. El periodo de producción de hidrógeno fue de 15 días durante el cual se mantuvo iluminación continua a 3 Klx que es equivalente a 9W para lámpara de tungsteno. Se obtuvo la relación de áreas entre la superficie iluminada del biorreactor y la esfera que rodea a la lámpara (de radio igual a la distancia entre foco y biorreactor). Para conocer la

densidad de intensidad luminosa $I=P/S=17.90 \text{ W/m}^2$ y con ello estimar la potencia real recibida por el biorreactor, (para más detalles ver Anexo F). Como el grueso de la producción de hidrógeno se obtiene al 6º día, en la tabla 47 se reporta las eficiencias luminosas a 6 y 15d. A 6d, las $\eta_{\text{H}_2/\text{luz}}$ son más altas y muy cercanas a los valores típicos reportados en la literatura (Uyar *et al.*, 2007; Abo-Hashesh *et al.*, 2011; Adessi *et al.*, 2010; Nath y Das, 2009). Como puede verse en la tabla 47, las eficiencias luminosas de la cepa pura y del consorcio G3 son similares.

Cabe destacar que en la mayoría de los trabajos emplean cepas puras y aguas residuales sintéticas (Tao *et al.*, 2008; Li y Fang, 2008; Shi y Yu, 2006), lo que encarece el proceso por el mantenimiento de condiciones de esterilidad. En nuestro caso la ventaja de usar un consorcio, es que no se tienen gastos por esterilidad de efluente y aún así se obtuvieron resultados favorables, como el no tener presencia de metano. Esto pudo deberse a que el influente tuvo un pH de 5.84, valor que no favorece la metanogénesis. Por otro lado, es importante resaltar que la intensidad luminosa empleada en algunos trabajos como el de Shi y Yu, 2006, Fascetti *et al.*, 1995 y Fang *et al.*, 2005 entre otros, de 10klx o más.

La producción acumulada de hidrógeno por G3 fue similar a la producción acumulada de Rp; no hubo un efecto positivo el empleo de una cepa pura. Esto nos lleva a pensar que al emplear a G3 podría con facilidad adaptarse el sistema a un proceso real. La única variable de respuesta donde se logra apreciar un efecto positivo es sobre la remoción de DQO, favorecida por G3 como se explica en párrafo anterior.

Acevedo-Benítez, (2009) reportó que los resultados con Rp y sus cultivos mixtos no tuvieron diferencia significativa en la remoción de DQO cuando empleó iluminación continua, pero sí sobre la producción de H_2 . En nuestro experimento se trabajó con iluminación continua y con Rp como cepa control, sin embargo la producción de H_2 fue similar para ambos cultivos, no así para la remoción de DQO donde es favorecida por G3.

Uyar *et al.* (2007), emplearon *R. sphaeroides* O.U. 001 (DSM 5864). Reportaron una eficiencia de luz del 0.54% para iluminación continua para un minirreactor de 55 mL y evaluaron diferentes valores para intensidad de luz.

Encontraron que a una intensidad de luz de 209 W/m^2 de un rango de 88 a 220 W/m^2 (ca. 1300-6000 lux) la eficiencia máxima de conversión de luz fue 0.65% en un biorreactor de 4.1L. Utilizaron malato como sustrato.

En la figura 37 se observa la dinámica de producción de hidrógeno, la producción de hidrógeno disminuyó en cada ciclo de venteo, asumiendo que es por el consumo de sustrato. Se realizó el venteo para asegurar que el cada monitoreo fuera una generación de hidrógeno y no un consumo del hidrógeno producido inicialmente.

Con los resultados obtenidos en esta última etapa, se valida la hipótesis general; se hizo el balance de producción de hidrógeno para conocer si en efecto la producción de hidrógeno en la fotofermentación fue al menos 50% mayor que la obtenida en la fermentación oscura. Se considera la mejor producción de hidrógeno en FASSH-VI, el cual estuvo a 18% de ST iniciales y se obtuvo $3.03 \text{ mol H}_2/\text{Kg ss}$, por otro lado 1 Kg FORSA contiene 81% de ST, obteniendo así 4.5 Kg de FA a 18% de ST, considerando que es la misma masa de sólidos gastados después de la fermentación oscura, se realiza el extracto de estos sólidos gastados haciendo una dilución 1:3, obteniendo 13.5 litros de extracto, a este extracto se le hace una dilución 1:10 para ser usado como sustrato en la fotofermentación, obteniendo así un total de 135 litros de extracto diluido. Ver Anexo F para la memoria de cálculo de las producciones de H_2 en fotoheretrofía. En la fotofermentación empleando el consorcio G3 se obtuvo $11.09 \text{ mmolH}_2/\text{L}_{\text{ext}}$ diluido, es decir, $1.848 \text{ molH}_2/\text{Kgss}$ y para *R. palustris* se obtuvo $11.81 \text{ mmolH}_2/\text{L}_{\text{ext}}$ diluido ($1.97 \text{ molH}_2/\text{Kgss}$).

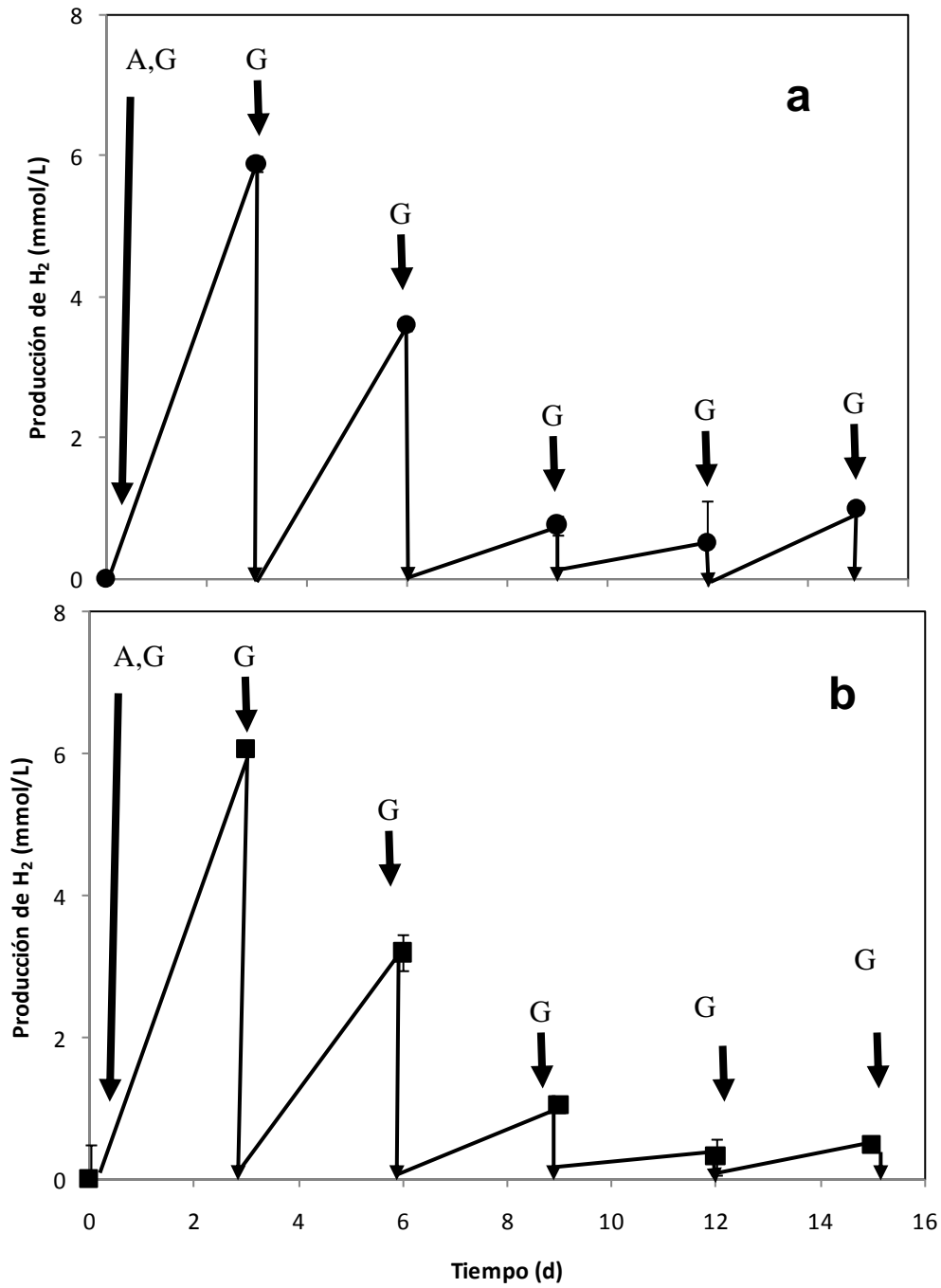


Figura 37. Producción de hidrógeno en fotofermentación en lote para (a) *Rhodospseudomonas palustris*, (b) G3 (las flechas indican el momento de gaseo)

En la tabla 48 se puede ver la producción de hidrógeno en un proceso de dos etapas, y se observa que el incremento de hidrógeno debido a la fotofermentación con Rp es del 65% ($1.97/3.03*100$) y el incremento debido a la fotofermentación con G3 es del 61% ($1.85/3.03*100$) (Ver Anexo F).

Tabla 48. Producción de hidrógeno en dos etapas

Fermentación oscura	Fotofermentación		Proceso en serie
	Rp	G3	
	molH ₂ /Kgss		
3.03	1.97	-	5.00
(60%)	(40%)		(100%)
3.03	-	1.85	4.88
(62%)		(38%)	(100%)

7.7. Resultados de la actividad extra. Caracterización de poblaciones microbianas en los reactores DASSA (esta actividad no está dentro de la estrategia de trabajo)

La extracción del DNA de las muestras se realizó en el laboratorio de bioingeniería de la ENCB, con la colaboración de la Dra. Cleotilde Juárez Ramírez.

De cada purga de los DASSM, se tomaron 5g para realizar la extracción de DNA. La purga corresponde a la primera alimentación con FORSA, esto con la finalidad de caracterizar el consorcio microbiano inicial. Se empleo el Ultra Clean Soil DNA kit, MoBio Laboratories, se siguió el protocolo en el kit, se extrajo DNA como se muestra en la figura 38. Posteriormente se amplificó usando dos iniciadores para una región variable del 16rDNS (Felske *et al.*, 1996) cuya secuencia se muestran a continuación.

Iniciador 1

U968

5' CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA
CGC GAG ACC CTT AC 3'

Iniciador 2

L1401

5' CGG TGT GTA CAA GAC CC 3'

Estos iniciadores son para bacterias. Del producto amplificado se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 500 pares de bases como se muestra en la figura 39. Con el DNA amplificado se corrieron geles de poliacrilamida bajo gradiente de temperatura, esta técnica se conoce como TGGE. Se realizaron geles de poliacrilamida para TGGE empleando 3 amplificados de DNA de las mismas muestras donde se observa el mismo patrón de bandas (figura 40).

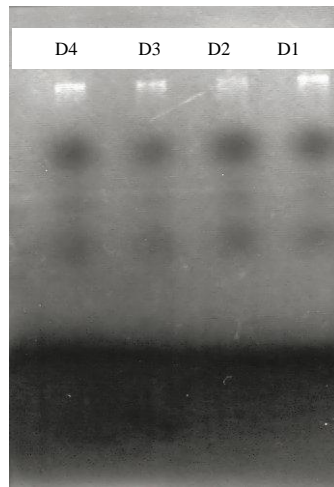


Figura 38. Gel de agarosa de los DASSM 1-4 (D1: DASSM-1, D2: DASSM-2, D3: DASSM-3, D4: DASSM-4)

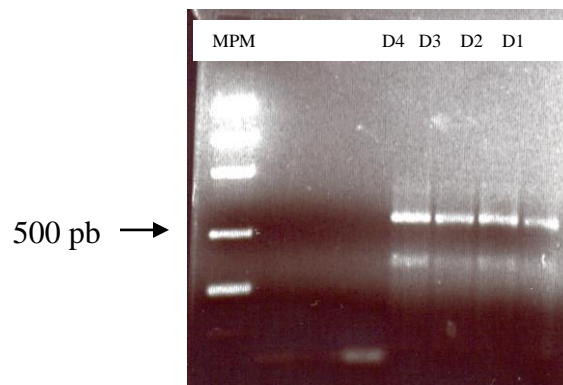
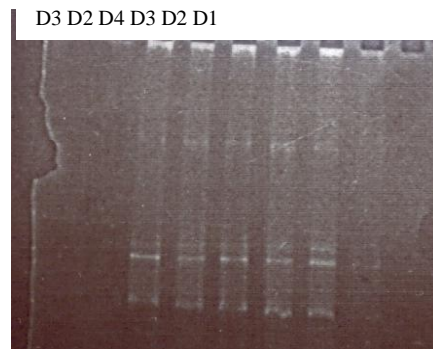
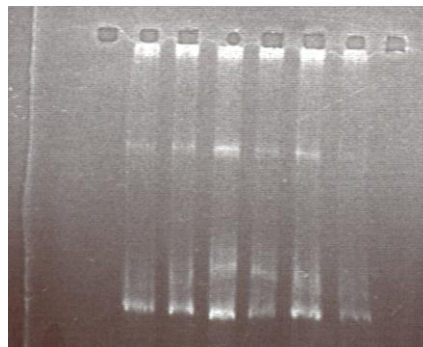


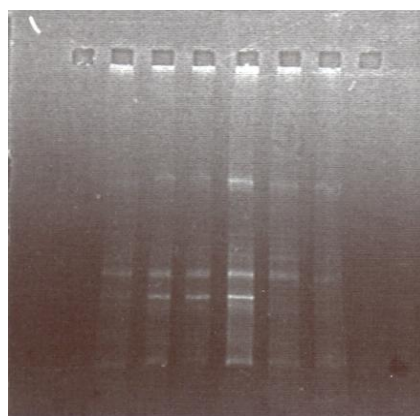
Figura 39. Gel de agarosa de los amplificadores del DNA de los DASSM 1-4 (D1: DASSM-1, D2: DASSM-2, D3: DASSM-3, D4: DASSM-4, MPM: marcador de peso molecular)



(a)



(b)



(c)

Figura 40. Geles de poliacrilamida de los DASSM 1-4, con un gradiente de temperatura de 39-52°C, 118V, 7mA durante 2 h, a) amplificado 1 de la extracción 1, b) amplificado 2 de la extracción 1, c) amplificado 1 de la extracción 2.

Lamentablemente no se logró una extracción exitosa del DNA de las bandas de los geles de TGGE.

Por otro lado, se realizó la extracción de DNA por métodos tradicionales en el laboratorio 34 del DBB con éxito, como se observa en la figura 41.

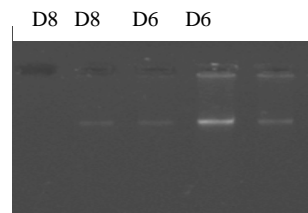


Figura 41. Gel de agarosa del DASSM-6 y DASSM-8

8. Conclusiones

Se desarrolló y evaluó un proceso biológico con etapas en serie para maximizar la producción de biohidrógeno a partir de residuos obtenidos de las actividades agrícolas y agroindustriales de la zona de la cuenca del Papaloapan, *i.e.*, bagazo de caña y de piña. El proceso se basó en fermentación normal en sustrato sólido en lote seguido de extracción y fotofermentación hidrogenogénica de los extractos.

Caracterización de los residuos sólidos agroindustriales.

Se caracterizó los residuos agroindustriales y se estableció una mezcla combinada de desechos que sirvió de alimentación a la primera etapa del proceso en serie, la FORSA. Esta mezcla tiene potencial hidrogenogénico dado su perfil de contenidos moderado a alto de celulosa y hemicelulosa.

Manejo de digestores anaerobios de sustrato sólido acidogénico en régimen mesofílico y termofílico.

La fermentación hidrogenogénica semicontinua de FORSA dio resultados muy pobres. Si bien se pudo evaluar el efecto del régimen térmico (mesofílico y termofílico) y del TRM sobre la producción de biohidrógeno en proceso DASSA, los resultados fueron desalentadores.

Mesofilia y tiempo de retención másica de 13 d fueron las condiciones en que produjo más bioH₂ con DASSA.

El contenido de sólidos totales de la alimentación afecta profundamente la actividad de agua (a_w) y potencial mátrico del sustrato. Muy probablemente la baja actividad de agua de FORSA a 35% ST utilizado en DASSA pudiera explicar el pobre desempeño de ese proceso. Esta hipótesis se exploró con los experimentos de FASSH-VI cuyas conclusiones se leen más abajo.

Por otro lado, la capacidad de retención de agua (CRA) de FORSA pudo haber tenido un efecto negativo en la disponibilidad de agua hacia los microorganismos, ya que la FORSA puede absorber 82.3% de su propio peso en agua.

La conductividad eléctrica de la FORSA fue baja (0.127 ± 0.017 mS/cm) este valor nos indica que el aporte de sales del sustrato no contribuye una presión osmótica al medio. La conductividad eléctrica de FORSA acondicionada no varió mucho con el contenido de ST, a pesar de que tiene aportes variables de solución amortiguadora, la cual provee de cationes y aniones extras.

Operación de minirreactores en fermentación anaerobia hidrogenogénica en sustrato sólido con venteo intermitente

Se evaluó el efecto del contenido de ST y pH inicial en la alimentación sobre la producción de biohidrógeno en FASSH-VI, los resultados indican que conforme aumenta la cantidad de sólidos totales se tienen un efecto negativo en la producción de hidrógeno. Se confirma que el intervalo que favorece la producción de hidrógeno es 6.0-6.5 para pH inicial y contenido de sólidos totales 18-20%.

Balance energético de DASSA-M, DASSA-T y FASSH-VI

Los balances energéticos de DASSA-mesofílico y DASSA-termofílico indican que DASSA-termofílico tiene una ganancia energética debida a la producción de bioH_2 , pues la energía asociada al H_2 es mucho mayor que los gastos de energía de calefacción de alimentación, pérdidas de calor del equipo principal y auxiliar, etc. Esto es válido para producciones de H_2 reportadas en la literatura (donde en ninguno de los casos han empleado residuos agroindustriales). No fue válido para la pobre producción de H_2 obtenida en la DASSA de FORSA de este trabajo.

Por otro lado, para FASSH-VI la energía requerida, es mayor a la generada por la combustión del hidrógeno producido. Para la DASSA-M el requerimiento energético es mucho mayor que, la que se genera por la combustión del hidrógeno producido.

Los extractos de sólidos gastados generados durante la fermentación hidrogenogénica de la FORSA resultaron ricos en ácidos orgánicos y en menor concentración de solventes. Por tanto, fueron un sustrato factible para una segunda etapa fotoheterótrofa productora de hidrógeno.

Desarrollo de bacterias púrpuras no sulfurosas (BPNS)

El método de presión selectiva basado sobre la operación de columnas de Winogradsky condujo a consorcios con atractiva capacidad de producción de hidrógeno, 11 mmol H₂/L para el consorcio G3.

Operación de fotobioreactores en lote

El consorcio G3 enriquecido en bacterias púrpuras no sulfurosas tuvo un desempeño similar a la cepa pura *Rodhospseudomonas palustris* en la producción en lote de H₂ utilizando extractos diluidos 1:10 de la fermentación hidrogenogénica en sustrato sólido. Por ejemplo, las P_{H₂} fueron 11.08 y 11.80, mientras que la eficiencia luminosa a 6 d fueron 1.27 y 1.30 para G3 y Rp, respectivamente. A su vez, estos valores se comparan favorablemente con la gama de valores reportados en la literatura internacional.

La etapa FFH significó una producción adicional de H₂ promedio del 65 y 61%, sobre la base de mmolH₂/kg ss para *Rodhospseudomonas palustris* y G3 respectivamente. Incidentalmente, en el tiempo operado en la fotofermentación no se presentó metano aún cuando el extracto de los sólidos gastados no fue esterilizado.

9. Referencias

- Acevedo-Benítez, J.A.; Valdez-Vazquez, I.; Poggi-Varaldo, H.M. 2006. *¿Cómo medir la diversidad?* Editores: Poggi-Varaldo, H.M.; Bátiz-Solórzano, M.E.; Pineda-Cruz, J.A.; Caffarel-Méndez, S. Cuaderno de Tecnología 3, Ed. TESE, Edo. de Méx., México. ISBN 968-5441-03-0. Libro en CD-ROM.
- Akkerman, I., Janssen, M., Rocha, J., Wijffels, R.H. 2002. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and birreactor design. *Int J Hydrogen Energy* 27: 1195-1208.
- Antonopoulou, G., Gabela, 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.
- Arooj, M. F., Han, S. K., Kim, S. H., Kim, D. H. Shin, H. S. 2007. Sludge characteristics in anaerobic SBR system producing hydrogen gas. *Water Res.* 41: 1177-1184.
- Asada, Y., Miyake, J., 1999. Photobiological hydrogen production. *J. Biosci. Bioeng.* 88 (1), 1–6.
- Atif, A.A.Y., Fakhru'l-Razi, A., Ngan, M.A., Morimoto, M., Iyuke, S.E., Veziroglou, N.T., 2005. Fed batch production of hydrogen from palm oil mill effluent using anaerobic microflora. *Int. J. Hydrogen Energy* 30, 1393–1397.
- Atlas, R.M., Bartha, R. 2006. *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. 4ta. Edición. Pearson Educación, S.A. Madrid, España.
- Baatout S., Leys N., Hendrickx L., Dams A., Mergeay M. 2007. Physiological changes induced in bacteria following pH stress as a model for space research. *Acta Astronautica*. 60: 451-459.
- Bélafi-Bakó, K., Búcsú D., Pientka, Z., Bálint, B., Herbel, Z., Kovács, K. L., Wessling, M. 2006. Integration of biohydrogen fermentation and gas separation processes to recover and enrich hydrogen. *Int. J. Hydrogen Energy*. 31: 1490 - 1495
- Benemann, J. 1996. Hydrogen biotechnology: progress and prospects. *Nature Biotechnol.* 14: 1101-1103.
- Bélafi-Bakó, K., Búcsú D., Pientka, Z., Bálint, B., Herbel, Z., Kovács, K. L., Wessling, M. 2006. Integration of biohydrogen fermentation and gas separation processes to recover and enrich hydrogen. *Int. J. Hydrogen Energy*. 31: 1490 – 1495
- Bitton, G. 2002. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, Inc., New York
- Borodin V.B., Tsygankov A.A., Rao K.K., Hall D.O., 2000. Hydrogen production by *Anabaena variabilis* PK84 under simulated outdoor conditions. *Biotechnol Bioeng.* 69(5): 478-485.
- Brock, T.D., Madigan, M.T. 1993. *Microbiología*. Sexta edición. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. México D.F., México.
- Brown, A.D. 1976. Microbial Water Stress. *Bacteriol. Rev.* 40 (4): 803-846.
- Cai G., Jin B., Saint C., Monis P. 2010. Metabolic flux analysis of hydrogen production network by *Clostridium butyricum* W5: Effect of pH and glucose concentrations. *Int J Hydrogen Energy*. 35: 6681-6690.
- Cámara Nacional de la Industria Azucarera y Alcoholera (CNIAA). 2004. Anuario.
- Cao X., Zhao Y. 2009. The Influence of sodium on biohydrogen production from food waste by anaerobic fermentation. *J Mater Cycles Waste Manag.* 11: 244-250.
- Carpenter, J. F. Crowe, J. H., Arakawa, T. 1990. Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in the frozen and dried states. *J Dairy Sci* 73: 3627-3636.
- Carpenter, P.L. 1977. *Microbiology*. 4th. edition. W.B. Saunders Company: West Washington Square, Philadelphia, PA. 19105.
- Castellan, G.W. 1987. *Fisicoquímica*. Segunda edición. SITESA sistemas técnicos de edición, S.A. de C.V. México, D.F.
- Chang, R., Goldsby, K.A. 2013. *Química*. Undécima edición. McGraw Hill education. México, D.F.
- Chen, V.Y., Lee, C.M., Chang, J.S. 2006. Feasibility study on bioreactor strategies for enhanced photohydrogen production from *Rhodospseudomonas palustris* WP3-5 using optical-fiber-assisted illumination systems. *Int J Hydrogen Energy*. 31:2345-2355.

- Chun-Yen C, Wei-Bin L, Ji-Fang W, Chang JS. 2007. Enhancing phototrophic hydrogen production of *Rhodospseudomonas palustris* via statistical experimental design. *Int J Hydrogen Energy*. 32: 940-949.
- Claassen, P.A.M., van Lier, J.B., Contreras, A.M.L., van Niel, E.W.J., Sijtsma, L., Stams, A.J.M., de Vries, S.S., Weusthuis, R.A., 1999. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52 (6): 741–755.
- Das, D. 2009. Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization. *Int J Hydrogen Energy*. 34: 7349–7357
- Das, D., Veziroglu T.N. 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int J Hydrogen Energy*. 26: 13-28.
- Demirbas, A., 2004. Combustion characteristics of different biomass fuels. *Prog. Energy Combust. Sci.* 30 (2), 219–230.
- Dharmagadda V.S.S., Nokes S.E., Strobel H.J., Flythe M.D. 2010. Investigation of the metabolic inhibition observed in solid-substrate cultivation of *Clostridium thermocellum* on cellulose. *Bioresour Technol.* 101:6039-6044.
- Escamilla-Alvarado, C., Ríos-Leal, E., Ponce-Noyola, M.T., Poggi-Varaldo, H.M. 2012. Gas biofuels from solid substrate hydrogenogenic–methanogenic fermentation of the organic fraction of municipal solid waste. *Process Biochemistry*. 47: 1572-1587.
- 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. *Int J Hydrogen Energy*. 38: 12527-12538.
- Fang, H., Liu, H. 2002. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresour Technol.* 82 (1): 87-93.
- Fang, H.H.P., Li, C., Zhang, T. 2006. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *Int J Hydrogen Energy*. 31: 683-692.
- Fascetti, E., D'Addario, E., Todini, O., Robertiello, A. 1998. Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes. *Int J Hydrogen Energy*. 23(9): 753–60.
- Fascetti, E., Todini, O. 1995. *Rhodobacter sphaeroides* RV cultivation and hydrogen production in a one- and two-stage chemostat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 300–5.
- Felske, A., Engelen, B., Nubel, U., Backhaus, H. 1996. Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 4162-4167.
- Frederick, A., Brent, M.R., Robert, E.K., David, D.M., Seidman, J.G., Smith, J.A. 2002. *Current Protocols in Molecular Biology*. 5th. Vol. 2. John Wiley & Sons Inc.
- García-Pérez, M., Chaala, A., Yang, J., Roy, C. 2001. Co-pyrolisis of sugarcane bagasse with petroleum residue; Part I: thermogravimetric analysis. *Fuel*. 80 (9): 1245-1258.
- Gressel, J. 2008. Transgenics are imperative for biofuel crops. *Plant Science*. 174: 246-263.
- Gupta, S.C., Larson, W.E. 1979. Estimating soil water retention characteristics from particle size distribution, organic matter percent, and bulk density. *Water Resources Research*. 15 (6): 1633–1635.
- Han, S.K., Shin, H.S. 2004. Performance of an innovative two-stage process converting food waste to hydrogen and methane. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 54: 242-249.
- Hawker, L.E., Linton, A.H. 1979. *Micro-organisms, function, form and environment*. 2nd edition. Edward Arnold. editorial Hodder Arnold H&S. Oxford, OX, United Kingdom.
- Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L., Hussy, I., 2002. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *Int J Hydrogen Energy* 27 (11–12): 1339-1347.
- He, D., Bultel, Y., Magnin, J.P., Roux, C., Willison, J.C. 2005. Hydrogen photosynthesis by *Rhodobacter capsulatus* and its coupling to a PEM fuel cell. *J Power Sources*. 141:19-23.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2005. Principales resultados por localidad (ITER).
- International Energy Agency (IEA), 1998. World Energy Outlook, 1998. Available from: www.iea.org

- Jenssen, M., Bresser, L., Baijens T., Tramper J., Mur L.R., Snel J., Wijffels R.H. 2000. Scale-up aspects of photobioreactors: effects of mixing-induced light/dark cycles *J. Applied Phycol.* 12: 225-237.
- Kapdan, I.K., Kargi, F., 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microbial Technol.* 38 (5), 569–582.
- Karlsson, A., Vallin, L., Ejlertsson, J. 2008. Effects of temperature, hydraulic retention time and hydrogen extraction rate on hydrogen production from the fermentation of food industry residues and manure. *Int J Hydrogen Energy.* 33: 953-962.
- Kim, I., Hwang, M., Jang, N., Hyun, S., Lee, S.T. 2004a. Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process. *Int J Hydrogen Energy.* 29: 1133-1140.
- Kim, S.H., Han, S.K., Shin, H.S. 2004b. Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge. *Int J Hydrogen Energy.* 29: 1607-1616.
- Koku, H., Eroğlu, I., Gündüz, U., Yücel, M., Türker, L. 2002. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Int J Hydrogen Energy.* 27: 1315-1329.
- Kotay, S.M., Das, D. 2007. Biohydrogen as a renewable energy resource-prospects and potentials. *Int J Hydrogen Energy.* 10:1016
- Kumar, N., Das, D. 2000. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochemistry,* 35: 589-593.
- Kyazze, G., Dinsdale, R., Guwy, A.J., Hawkes, F.R., Premier, G.C., Hawkes, D.L. 2006. Performance characteristics of a two-stage dark fermentative system producing hydrogen and methane continuously. *Biotechnol Bioeng.* 97: 759-770.
- Kyazze, G., Martinez-Perez, N., Dinsdale, R., Premier, G.C, Hawkes, F.R., Guwy, A.J., Hawkes, D.L. 2006. Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production. *Biotechnol Bioeng.* 93: 971-979
- Lata, D.B., Chandra, R., Kumar, A., Misra, A. 2007. Effect of light on generation of hydrogen by *Halobacterium halobium* NCIM 2852. *Int J Hydrogen Energy.* 32: 3293-3300.
- Laurie, J.C., Roar, L.I. 1991. Hydrogen gas production by an *Ectothiorhodospira vacuolata* strain. *Appl Environ Microbiol.* 57: 594 - 596.
- Lehninger, A.L. (1978). *Bioquímica*, 2ª ed. Omega, Barcelona.
- Leslie, S. B., Teter. S. A., Crowe, L. M. Crowe, J. H. 1994. Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1192:7-13.
- Levin, D., Pitt, L., Love, M. 2004. Biohydrogen Production: Prospects and Limitations to Practical Application. *Int. J. Hydrogen Energy.* 29: 173-185.
- Li, R. Y., Fang, H. H. P. 2008. Hydrogen production characteristics of photoheterotrophic *Rubrivivax gelatinosus* L31. *Int J Hydrogen Energy.* 33: 974-980.
- 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 Res.* 40: 2230-2236.
- Logan, B., Oh, S., Kim, I. S. and Van Ginkel, S. 2002. Biological Hydrogen Production Measured in Batch Anaerobic Respirometers. *Environ. Sci. Technol.* 36: 2530 -2535.
- Louis, P., Truper. H.G., Galinski, E.A. 1994. Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 684 - 688.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2002. Brock. *Biología de los Microorganismos*. 10ma edición. Editorial Pearson Prentice Hall. Madrid, España.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P. 2009. Brock. *Biología de los Microorganismos*. 12 edición. Editorial Pearson Addison Wesley. México, D.F., México.
- Mahro, B., Grimme, L.H. 1982. H₂-photoproduction by green algae: the significance of anaerobic pre-incubation periods and of high light intensities for H₂ photoproduktivty of *Chlorella fusca*. *Arch Microbiol.* 132:82-86.
- Manish, S., Banerjee, R. 2008. Comparison of biohydrogen production processes. *Int J Hydrogen Energy.* 33:279-286.
- Melis A., Zhang L., Foriester M., Ghirardi M.L., Seibert M., 2000. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant. Physiology.* 122:127-135.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry.* 31 (3):426-428.

- Modigell, M., Schumacher, M., Teplyakov, V., Zenkevich, V. B. 2008. A membrane contactor for efficient CO₂ removal in biohydrogen production. *Desalination*. 224:186-190.
- Mohan S.V., Babu V.L., Sarma P.N. 2008a. Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresour Technol*. 99:59-67.
- Mohan, S.V., Bhaskar, Y.V., Sarma, P.N. 2007. Biohydrogen production from chemical wastewater treatment in biofilm configured reactor operated in periodic discontinuous batch mode by selectively enriched anaerobic mixed consortia. *Water Res*. 41: 2652-2664.
- Mohan, S.V., Mohanakrishna, G., Sarma, P.N. 2008b. Integration of acidogenic and methanogenic processes for simultaneous production of biohydrogen and methane from wastewater treatment. *Int J Hydrogen Energy*. 33: 2156-2166.
- Morita M., Watanabe Y., Saiki H. 2000. High photosynthetic productivity of green microalga *Chlorella sorokiniana*. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 87: 203-218.
- Mu, Y., Yu, H. Q., Wang, G. 2007. A kinetic approach to anaerobic hydrogen-producing process. *Water Res*. 41:1152-1160.
- Muñoz-Páez, K.M., Ríos-Leal, E., Valdez-Vazquez, I., Rinderknecht-Seijas, N., Poggi-Varaldo, H.M. 2012. Re-fermentation of washed spent solids from batch hydrogenogenic fermentation for additional production of biohydrogen from the organic fraction of municipal solid waste. *J Environ Management*. 95: S355-S359.
- Muñoz-Páez, K.M., Ruiz-Ordaz, N., García-Mena, J., Ponce-Noyola, M.T., Ramos-Valdivia, A.C., Robles-González, I.V., Villa-Tanaca, L., Barrera-Cortes, J., Rinderknecht-Seijas, N., Poggi-Varaldo, H.M. 2013. Comparison of biohydrogen production in fluidized bed bioreactors at room temperature and 35°C. *Int J Hydrogen Energy*. 38: 12570-12579.
- Nandi, R., Sengupta, R., 1998. Microbial production of hydrogen: an overview. *Crit. Rev. Microbiol*. 24 (1), 61–84.
- Noparat, P., Prasertsan, P., O-Thong, S. 2012. Potential for using enriched cultures and thermotolerant bacterial isolates for production of biohydrogen from oil palm sap and microbial community analysis. *Int J Hydrogen Energy*. 37:16412-16420.
- Oh, S., Van Ginkel, S., Logan, B. 2003. The relative effectiveness of pH control and head treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environ. Sci. Technol*. 37: 5186-5190.
- Oleszkiewicz, J., Poggi-Varaldo, H.M. 1997. High solids anaerobic digestion of mixed municipal and industrial waste. *J Environ Eng*. 123:1087-92.
- Park, W., Hyun, S., Oh, S., Logan, B., Kim, I. 2005. Removal of headspace CO₂ increases biological hydrogen production. *Environ. Sci. Technol*. 39 (12): 4416-4420.
- Poggi-Varaldo, H.M., Oleszkiewicz, J.A. 1992. Anaerobic co-composting of municipal solid waste and waste sludge at high total solids levels. *Environ Technol*. 13:409–421.
- Putnam PC. 1953. *Energy in the Future*. Van Nostrand. Nueva York, EUA.
- Rachman M.A., Furutani Y., Nakashimada Y., Kakizono T., Nishio N. 1997. Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*. *J. Ferment. Bioeng*. 83:358-363.
- Ramos, A., Raven, N.D.H., Sharp, R.J., Bartolucci, S., Rossi, M., Cannio, R., Lebbink, J., van der Oost, J., de Vos, W. M., Santos, H. 1997. Stabilization of enzymes against thermal stress and freeze-drying by mannosylglycerate. *Appl. Environ. Microbiol*. 63: 4020-4025.
- Reith, J.H., Wijffels, R.H., Barten, H. 2003. *Introduction: the perspectives of biological methane and hydrogen production. Bio-methane and Bio-hydrogen*. In: Reith, J.H., Wijffels, R.H. and Barten, H. (Editores). ISBN: 90-9017165-7. La Haya, Holanda.
- Ren N.Q., Wang B.Z., Huang J.C. 1997. Ethanol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor. *Biotechnol Bioeng*. 54(5):428-433.
- Rudolph, A. S., Crowe, J. H. Crowe, L. M. 1986. Effects of three stabilizing agents proline, betaine, and trehalose on membrane phospholipids. *Arch. Biochem. Biophys*. 245: 134-143.
- Sasikala, K., Ramana, C.V., Rao, P.R., Subrahmanyam, M. 1990. Effect of gas phase on the photoproduction of hydrogen and substrate conversion efficiency in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. *Int J Hydrogen Energy*, 15(11), 795-797.
- Scheie, P.O. 1970. Environmental limits of cellular existence. *J theor. Biol*. 20:315-325.
- Schlegel, H.G. 1997. *Microbiología General*. 4ta edición. Omega. Islas Baleares, España.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2006.

- Shi X.Y., Yu H.Q. 2006. Conversion of individual and mixed volatile fatty acids to hydrogen by *Rhodospseudomonas capsulate*. *Int Biodeter Biodegr.* 58: 82–88.
- Siriwongrungson, V., Zeng, R.J., Angelidaki, I. 2007. Homoacetogenesis as the alternative pathway for H₂ sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed methanogenesis. *Water Res.* 41: 4204-4210.
- Sparling, R., Daniels, L. 1987. The specificity of growth inhibition of methanogenic bacteria by bromoethanolsulfonate. *Can J Microbiol.* 33: 1332-1336.
- Sparling, R., Risbey, D., Poggi-Varaldo, H.M. 1997. Hydrogen production from inhibited anaerobic composters. *Int J Hydrogen Energy.* 22: 563-566.
- Sung, S., Raskin, L., Padmasiri, S., Simmons, J. 2002. Hydrogen production by anaerobic microbial communities exposed to repeated heat treatments. Proceedings of the 2002 U.S. DOE Hydrogen Program Review NREL/CP: 610-32405. 1-17. Urbana, IL 61801-2352, U.S.A.
- Taguchi F., Mizukami N., Saito-Taki T., Hasegawa K. 1995. Hydrogen production from continuous fermentation of xylose during growth of *Clostridium* sp. Strain No.2. *Can J Microbiol.* 41: 536-540.
- Takabatake, H., Suzuki, K., Ko, I.B., Noike, T. 2004. Characteristics of anaerobic ammonia removal by a mixed culture of hydrogen producing photosynthetic bacteria. *Bioresource Technol.* 95: 151-158.
- Tanisho, S., Ishiwata, Y. 1995. Continuous hydrogen production from molasses by fermentation using foam as a support of flocks. *Int J Hydrogen Energy.* 20: 541–545.
- Tao, Y., He, Y., Wu, Y., Liu, F., Li, X., Zong, W., Zhou, Z. 2008. Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment. *Int J Hydrogen Energy.* 33: 963-973.
- Terry, K.L. 1986. Photosynthesis in modulated light: quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 988-995.
- Ueno, Y., Kawai, T., Sato, S., Otsuka, S., Morimoto, M. 1995. Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora. *J. Ferment. Bioeng.* 79(4): 395-397.
- Ueno, Y., Sasaki, D., Fukui, H., Haruta, S., Ishii, M., Igarashi, Y. 2006. Changes in bacterial community during fermentative hydrogen and acid production from organic waste by thermophilic anaerobic microflora. *J. Appl. Microbiol.* 101: 331-343.
- Ueno, Y., Tatara, M., Fukui, H., Makiuchi, T., Goto, M., Sode, K. 2007a. Production of hydrogen and methane from organic solid wastes by phase-separation of anaerobic process. *Bioresour. Technol.* 98: 1861-1865.
- Ueno, Y., Fukui, H., Goto, M. 2007b. Operation of two-stage fermentation process producing hydrogen and methane from organic waste. *Environ. Sci. Technol.* 41: 1413-1419.
- Valdez-Vazquez I., Poggi-Varaldo H.M. 2009. Alkalinity and high total solids affecting H₂ production from organic solid waste by anaerobic consortia. *Int J Hydrogen Energy.* 34: 3639-3646.
- Valdez-Vazquez, I., Rios-Leal, E., Carmona-Martinez, A., Munoz-Paez, K.M., Poggi-Varaldo, H.M. 2006. Improvement of biohydrogen production from solid wastes by intermittent venting and gas flushing of batch reactors headspace. *Environ Sci Technol.* 40: 3409-3415.
- Valdez-Vázquez, I., Ríos-Leal, E., Esparza-García, F., Cecchi, F., Poggi-Varaldo, H.M. 2005b. Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *Int. J. Hydrogen Energy,* 30:1383-1391.
- Valdez-Vazquez, I., Rios-Leal, E., Munoz-Paez, K.M., Carmona-Martinez, A., Poggi-Varaldo, H.M. 2006b. Effect of inhibition treatment, type of inocula, and incubation temperature on batch H₂ production from organic solid waste. *Biotechnol Bioeng.* 95: 342-349.
- Valdez-Vazquez, I., Sparling, R., Risbey, D., Rinderknecht-Seijas, N., Poggi-Varaldo, H.M. 2005a. Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill waste. *Bioresource Technol.* 96:1907-1913.
- Van Ginkel, S., Sung, S. 2001. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4726-4730.
- Van Ginkel, S. W. 2005. Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. *Int. J. Hydrogen Energy,* 30 (15): 1535-1542.

- Woodward, J., Orr, M., Cordray, K., Greenbaum, E. 2000. Enzymatic production of biohydrogen. *Nature*. 405:1014-1015.
- Wykoff D.D., Davies J.P., Melis A., Grossman A.R.1998. The regulation of photosynthetic electron-transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*. 117: 129-139.
- Yetis, M., Gündüz, U., Eroglu, I., Yücel, M., Türker, L. 2000. Photoproduction of hydrogen from sugar refinery wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* O. U. 001. *Int J Hydrogen Energy*. 25:1035-1041.
- Younesi, H., Najafpour, G., Ismail, K.S.K., Mohamed, A.R., Kamaruddin, A.H. 2008. Biohydrogen production in a continuous stirred tank bioreactor from synthesis gas by anaerobic photosynthetic bacterium: *Rhodospirillum rubrum*. *Bioresource Technol*. 99:2612-2619.
- Zabut, B., Kahlout, K., Yücel, M., Gündüz, U., Türker, L., Eroglu, I. 2006. Hydrogen gas production by combined systems of *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 and *Halobacterium salinarum* in a photobioreactor. *Int J Hydrogen Energy*. 31: 1553-1562.
- Zárate-Segura, P.B., Rios-Leal, E., Esparza-Garcia, F.J., Garcia-Mena, J., Sanz, J.L., Zaiat, M., Poggi-Varaldo, H.M. 2004. Perchloroethylene removal in two anaerobic continuous systems. *Interciencia*. 29 (10): 562-567
- Zhang, T., Liu, H., Fang, H. 2003. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *J. Environ Manag*. 69: 149-156.
- Zhang, W., Ma, Y., Wang, C., Li, S., Zhang, M., Chu, F. 2013. Preparation and properties of lignin–phenol–formaldehyde resins based on different biorefinery residues of agricultural biomass. *Industrial Crops and Products*. 43: 326-333.

Anexo A. Producción del trabajo de tesis

A1. Artículos en revista indexadas Thomson-Reuters

Robledo-Narváez, P.N.; Muñoz-Páez, K.M.; Poggi-Varaldo, H.M.; Ríos-Leal, E.; Calva-Calva, G.; Ortega-Clemente, L.A.; Rinderknecht-Seijas, N.; Estrada-Vazquez, C.; Ponce-Noyola, M.T., Salazar-Montoya, J.A. (2013). The Influence of Total Solids Content and Initial pH on Batch Biohydrogen Production by Solid Substrate Fermentation of Agroindustrial Wastes. *J. Environ. Manage.* 128: 126-138.

Robledo-Narváez, P.N., Ríos-Leal, E., Rinderknecht-Seijas, N., Ortega-Clemente, A., Ponce-Noyola, M.T., Poggi-Varaldo, H.M. (2012). System for biohydrogen and bioelectricity generation: A crucial component of biorefineries. *Environ Engineering Manage J.* 11 (3):S53. ISSN 1843-3707

Sánchez-Hernández, G., **Robledo-Narváez**, P., Ponce-Noyola, M.T., Ríos-Leal, E., Rinderknecht-Seijas, N., Poggi-Varaldo, H.M. (2012). Biohydrogen production improved with succinate supplementation using *Rhodopseudomonas palustris* and mixed culture of non-sulfur purple bacteria. *Environ Engineering Manage J.* 11 (3):S148. ISSN 1843-3707

A2. Capítulos en libros.

Robledo-Narváez, P.N., Calva-Calva, G., Ponce-Noyola, T., Ríos-Leal, E., Poggi-Varaldo, H.M. (2013). Biohydrogen and bioelectricity generation: Core processes in biorefinery of organic solid wastes. *Bioremediation and sustainable environmental technologies. Second International symposium on bioremediation and sustainable environmental technologies.* Jacksonville, FL., Jun 10-13, 2013. ISBN 978-0-9819730-7-4. Battelle Memorial Institute, Columbus, OH. www.battelle.org/biosymp.

Muñoz-Páez, K.M., Poggi-Varaldo, H.M., Sánchez-Hernández, G., **Robledo-Narváez**, P., Ponce-Noyola, M.T., Ríos-Leal, E., Rinderknecht-Seijas, N. (2013). Effect of ammonia addition in photoheterotrophic hydrogen production from effluents of dark fermentation of cheese whey. *Bioremediation and sustainable environmental technologies. Second International symposium on bioremediation and sustainable environmental technologies.* Jacksonville, FL., Jun 10-13, 2013. ISBN 978-0-9819730-7-4. Battelle Memorial Institute, Columbus, OH. www.battelle.org/biosymp.

Muñoz-Páez, K.M., **Robledo-Narváez**, P., Escamilla-Alvarado, C., Ríos-Leal, E., García-Mena, J., Poggi-Varaldo, H.M. (2011). A review on biohydrogen from heterotrophic photofermentation. *Bioremediation and sustainable environmental technologies. International symposium on bioremediation and sustainable*

environmental technologies. Reno, NV; Jun 27-30, 2011. ISBN 978-0-9819730-4-3. Battelle Memorial Institute, Columbus, OH. www.battelle.org/biosymp.

Poggi-Varaldo, H.M., **Robledo-Narváez**, P., Muñoz-Páez, K., Ríos-Leal, E., Ponce-Noyola, M.T., Ortega-Clemente, A., Estrada-Vázquez, C., Rinderknecht-Seijas, N. (2011). Biohydrogen from batch solid substrate fermentation of agroindustrial waste. Bioremediation and sustainable environmental technologies. International symposium on bioremediation and sustainable environmental technologies. Reno, NV; Jun 27-30, 2011. ISBN 978-0-9819730-4-3. Battelle Memorial Institute, Columbus, OH. www.battelle.org/biosymp.

Poggi-Varaldo, H.M., **Robledo-Narváez**, P.N., Calva-Calva, G., Ponce-Noyola, M.T., Ríos-Leal, E., Galíndez-Mayer, J., Olvera-Ramírez, R., Estrada-Vázquez, C., Rinderknecht-Seijas, N. (2010). Capítulo 3. Uso de residuos agroindustriales en la generación de biohidrógeno. Energías renovables biológicas-Hidrógeno-Pilas de combustible-II. Editores: Elvira Ríos-Leal, Omar Solorza-Feria, Héctor M. Poggi-Varaldo. México D.F., México. 2010. ISBN 978-607-00-3608-8.

Muñoz-Páez, K., **Robledo-Narváez**, P.N., Ríos-Leal, E., Rinderknecht-Seijas, N., Poggi-Varaldo, H.M. (2010). Capítulo 4. Fotofermentación heterótrofa y biohidrógeno. Energías renovables biológicas-Hidrógeno-Pilas de combustible-II. Editores: Elvira Ríos-Leal, Omar Solorza-Feria, Héctor M. Poggi-Varaldo. México D.F., México. 2010. ISBN 978-607-00-3608-8.

A3. Artículos completos en congresos.

Poggi-Varaldo, H.M., **Robledo-Narváez**, P.N., Muñoz-Páez, K.M., Escamilla-Alvarado, C., Ponce-Noyola, M.T., Calva-Calva, G., Ríos-Leal, E., Galíndez-Mayer, J., Rinderknecht-Seijas, N.F., Estrada-Vázquez, C., Ortega-Clemente, A. (2013). An overview of hydrogen fermentation, methane and bioelectricity as key contributions to biorefineries of organic wastes. XIII Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana del Hidrógeno. Aguascalientes, México, 2013.

Robledo-Narváez, P., Estrada-Vázquez, C., Galíndez-Mayer, J., Ortega-Clemente, A., Ponce-Noyola, M.T., Poggi-Varaldo, H.M. (2010). Influence of total solids content and initial pH on batch biohydrogen production by solid substrate fermentation of agroindustrial wastes. 14th International Biotechnology symposium and exhibition. IBS 2010. Biotechnology for the sustainability of human society. 14-18 september, 2010. Paalacongressi, Rimini, Italy. In: 14th International Biotechnology Symposium. Published in CD-ROM without page numbering. www.ibs2010.org.

Robledo-Narváez, P.N., Calva-Calva, G., Ponce-Noyola, M.T., Ríos-Leal, E., Galíndez-Mayer, J., Olvera-Ramírez, R., Estrada-Vázquez, C., Ortega-Clemente, L.A. Poggi-Varaldo, H.M. (2010). Evaluation of Batch Biohydrogen Production at Different Total Solids Content and Initial pH Using Solid Substrate Fermentation of Organic Waste. 12th World Congress on Anaerobic Digestion. Noviembre 1-4, Guadalajara, México.

Robledo-Narváez P.N., Escamilla-Alvarado, C., Poggi-Varaldo, H.M. (2008) Energy balance demonstrates that solid substrate thermophilic hydrogenesis is energetically feasible. Proceedings of The First International Congress on Biotechnology and Bioengineering. Noviembre 5-7, Ciudad de México, México.

Montiel-Corona, V., **Robledo-Narváez**, P.N., Guevara-García, J.A., Poggi-Varaldo, H.M. (2008). An overview on biohydrogen using photoheterotrophic Microorganisms. Proceedings of The First International Congress on Biotechnology and Bioengineering. Noviembre 5-7, Ciudad de México, México.

A4. Resúmenes en congresos.

Robledo-Narváez, P.N., Ortega-Clemente, A., Estrada-Vázquez, C., Galíndez-Mayer, J., Olvera-Ramírez, R., Ponce-Noyola, M.T., Ríos-Leal, E., Esparza-García, F., Rinderknecht-Seijas, N., Poggi-Varaldo, H.M. (2009). Efecto del tiempo de retención másico sobre la producción fermentativa mesofílica de hidrógeno. VIII Congreso Internacional de Ciencias Ambientales. XIV Congreso Nacional de Ciencias Ambientales. 3er Congreso de Medio Ambiente. Santa Cruz Tlaxcala, México, 1-5 de Junio de 2009.

Robledo-Narváez, P., Escamilla-Alvarado, C., Poggi-Varaldo, H.M. (2008). Biohydrogen from waste and combination of biological processes for energy yield improvement: A review. The third international meeting on environmental biotechnology and engineering (3IMEBE). Palma de Mallorca, Spain, September 21-25, 2008.



The influence of total solids content and initial pH on batch biohydrogen production by solid substrate fermentation of agroindustrial wastes



Paula N. Robledo-Narváez^a, Karla M. Muñoz-Páez^a, Hector M. Poggi-Varaldo^{a,*},
Elvira Ríos-Leal^b, Graciano Calva-Calva^a, L. Alfredo Ortega-Clemente^c,
Noemí Rinderknecht-Seijas^d, Carlos Estrada-Vázquez^e, M. Teresa Ponce-Noyola^a,
J. Alfredo Salazar-Montoya^a

^a Dept. of Biotechnology and Bioengineering, Environmental Biotechnology and Renewable Energies R and D Group, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México

^b Central Analítica, Dept. of Biotechnology and Bioengineering, CINVESTAV, México

^c Instituto Tecnológico de Boca del Río, Veracruz, México

^d ESQUE-IPN, Division Basic Sciences, México D.F., México

^e Universidad del Mar, Puerto Ángel, Oaxaca, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 September 2012

Received in revised form

4 April 2013

Accepted 17 April 2013

Available online 31 May 2013

Keywords:

Agricultural wastes

Batch dark fermentation

Hydrogen

pH

Total solids

ABSTRACT

Hydrogen is a valuable clean energy source, and its production by biological processes is attractive and environmentally sound and friendly. In México 5 million tons/yr of agroindustrial wastes are generated; these residues are rich in fermentable organic matter that can be used for hydrogen production. On the other hand, batch, intermittently vented, solid substrate fermentation of organic waste has attracted interest in the last 10 years. Thus the objective of our work was to determine the effect of initial total solids content and initial pH on H₂ production in batch fermentation of a substrate that consisted of a mixture of sugarcane bagasse, pine apple peelings, and waste activated sludge. The experiment was a response surface based on 2² factorial with central and axial points with initial TS (15–35%) and initial pH (6.5–7.5) as factors. Fermentation was carried out at 35 °C, with intermittent venting of mini reactors and periodic flushing with inert N₂ gas. Up to 5 cycles of H₂ production were observed; the best treatment in our work showed cumulative H₂ productions (ca. 3 mmol H₂/g_{ds}) with 18% and 6.65 initial TS and pH, respectively. There was a significant effect of TS on production of hydrogen, the latter decreased with initial TS increase from 18% onwards. Cumulative H₂ productions achieved in this work were higher than those reported for organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) and mixtures of OFMSW and fruit peels waste from fruit juice industry, using the same process. Specific energetic potential due to H₂ in our work was attractive and fell in the high side of the range of reported results in the open literature. Batch dark fermentation of agrowastes as practiced in our work could be useful for future biorefineries that generate biohydrogen as a first step and could influence the management of this type of agricultural wastes in México and other countries and regions as well.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

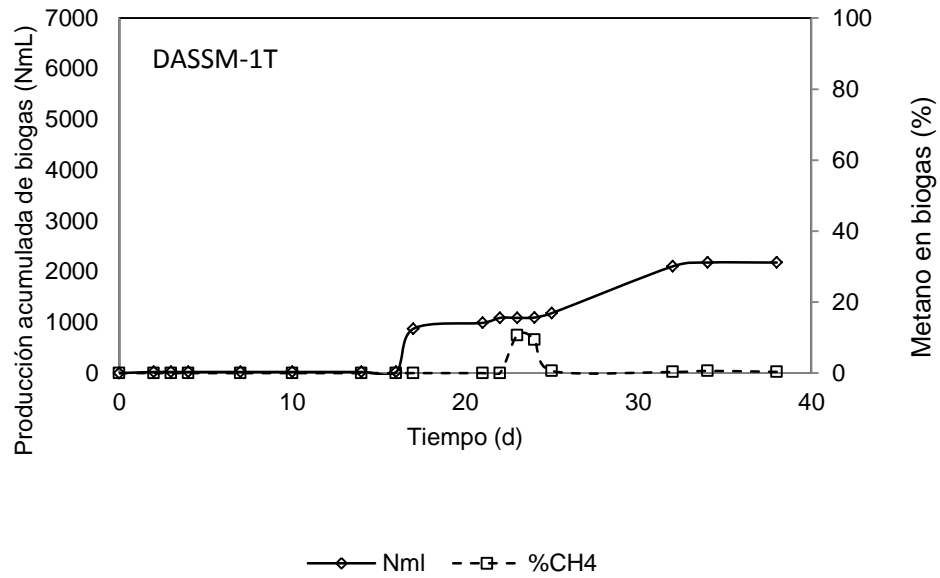
The rhythm of fossil fuels utilization of our modern societies is clearly unsustainable due to their scarcity, price instability, and

adverse environmental impacts. Recently, a variety of alternative fuels has been proposed to replace fossil fuels. In this regard, hydrogen is recognized as a promising future energy carrier because it is environmentally-friendly and sustainable (Valdez-Vázquez and Poggi-Varaldo, 2009a; Das and Veziroglu, 2001; Chong et al., 2009); produces only water when burned; and exhibits a higher calorific value (122 kJ/g; 2.75 fold of hydrocarbon fuels, Chang and Lin, 2004; Kim et al., 2006; Aceves-Lara et al., 2008; Mizuno et al., 2002; Das, 2009). The H₂ can be utilized for direct combustion in an internal combustion engine in a fuel cell and its energy-conversion efficiency can be as high as 50–70% (Kotay and Das, 2008; Lee and Rittmann, 2009; Li et al., 2010).

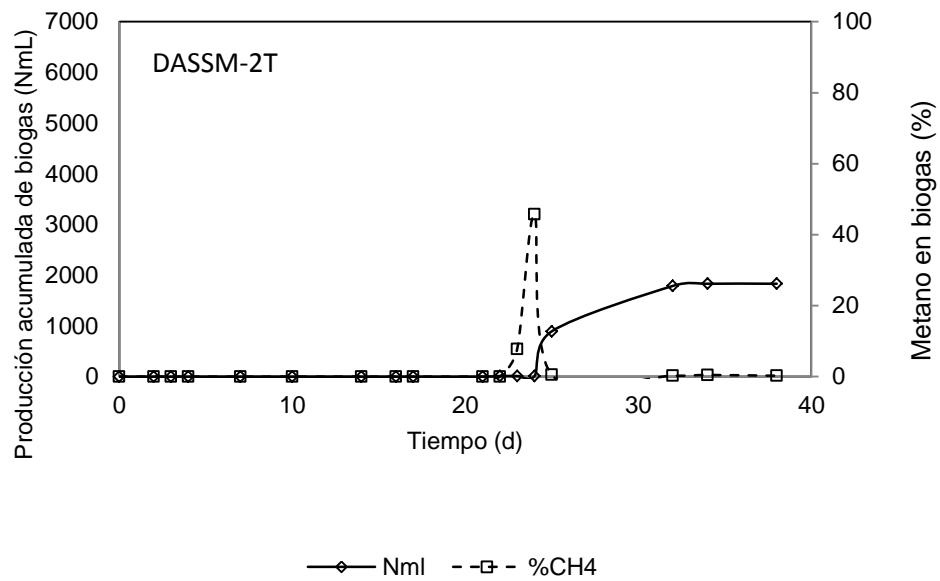
* Corresponding author, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Dept. of Biotechnology and Bioengineering, Environmental Biotechnology and Renewable Energies R and D Group, P.O. Box 14-740, México D.F. 07000, Mexico. Tel.: +52 55 57473800x4324; fax: +52 55 57473315.

E-mail addresses: hectorpoggi2001@gmail.com, r4cep@ yahoo.com (H.M. Poggi-Varaldo).

Anexo B. Producción de biogás y metano en los DASSM-T

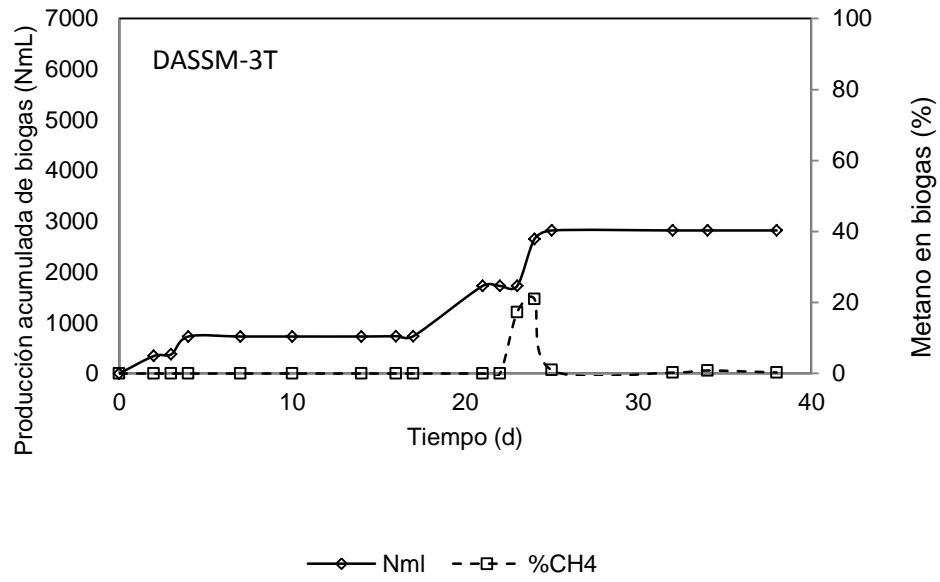


(a)

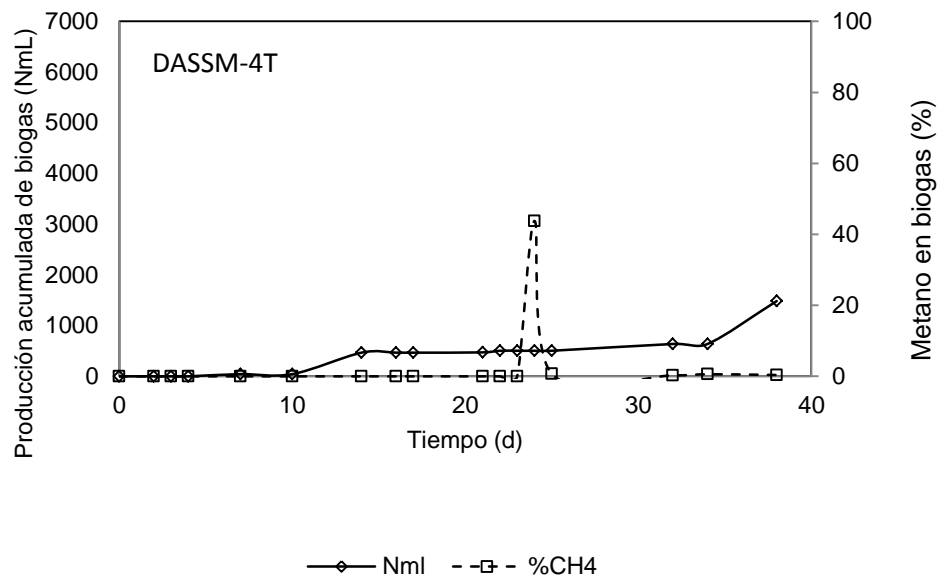


(b)

Figura B1. Producción acumulada de biogás y % de metano en: a) DASSM-1T y b) DASSM-2T

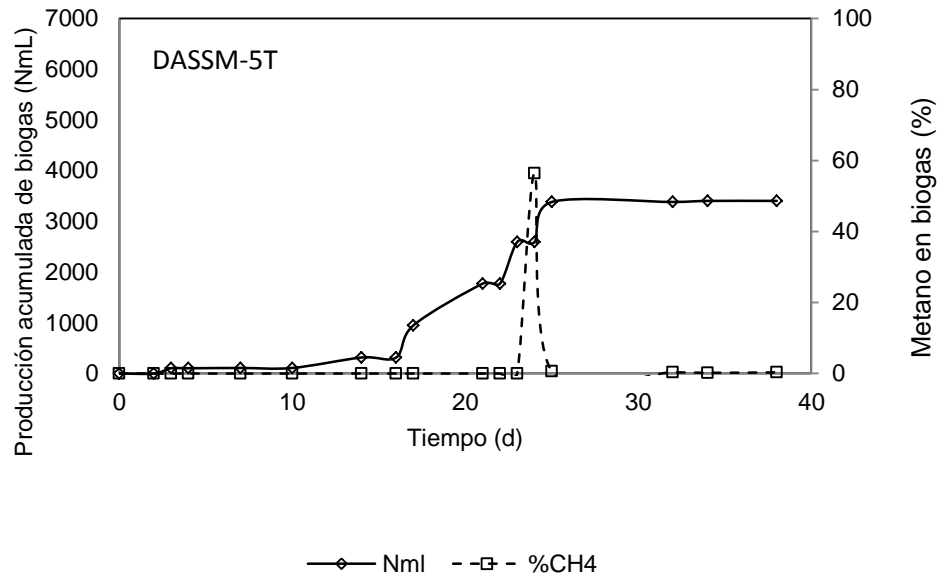


(a)

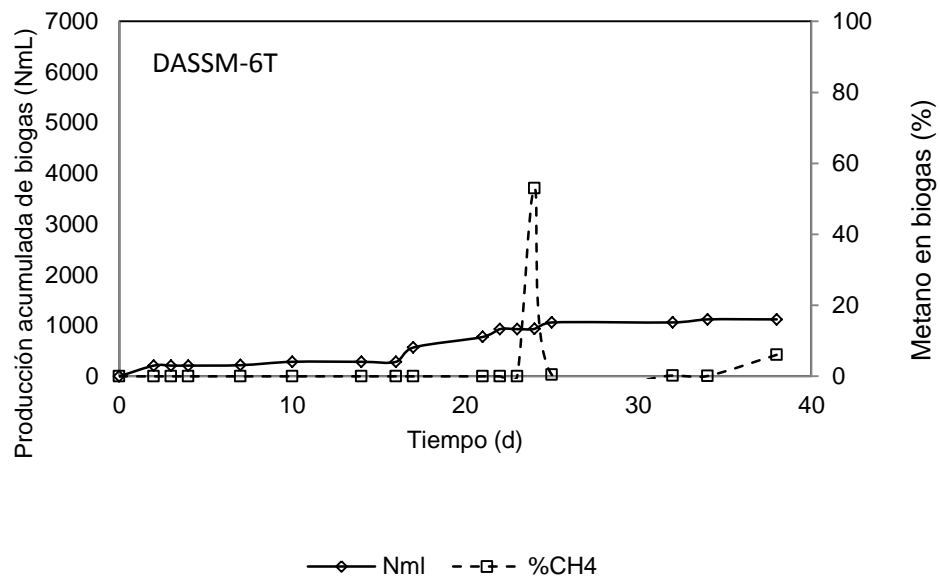


(b)

Figura B2. Producción acumulada de biogás y % de metano en: a) DASSM-3T y b) DASSM-4T

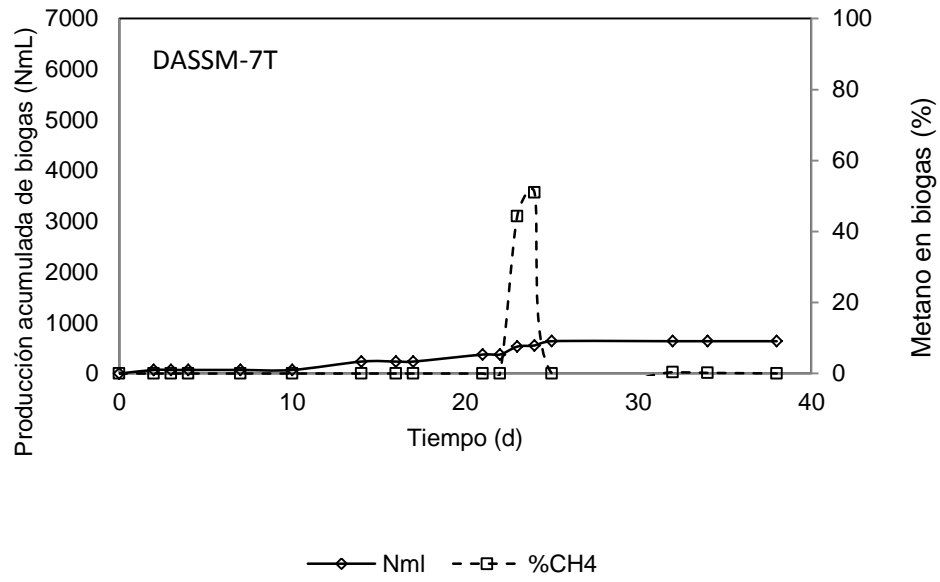


(a)

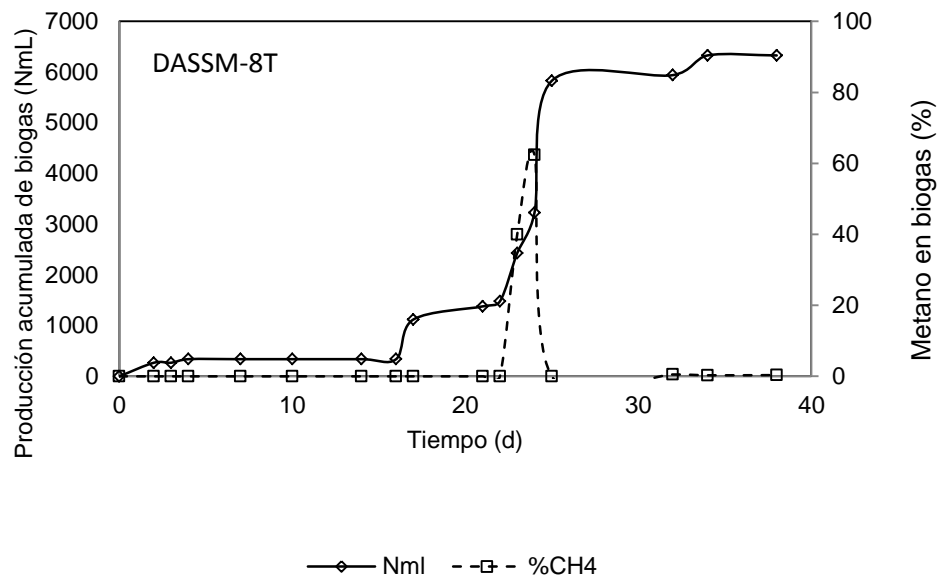


(b)

Figura B3. Producción acumulada de biogás y % de metano en: a) DASSM-5T y b) DASSM-6T

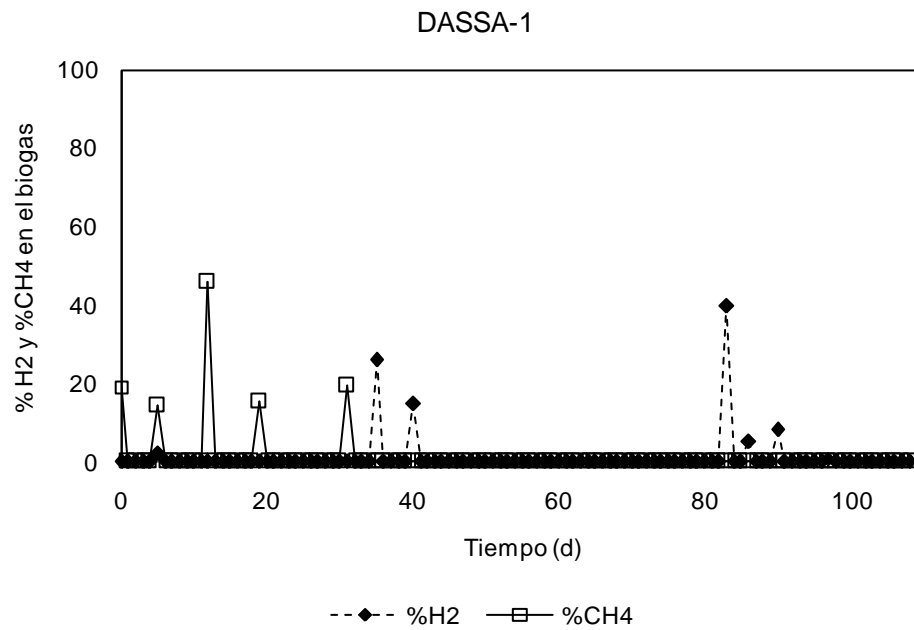


(a)

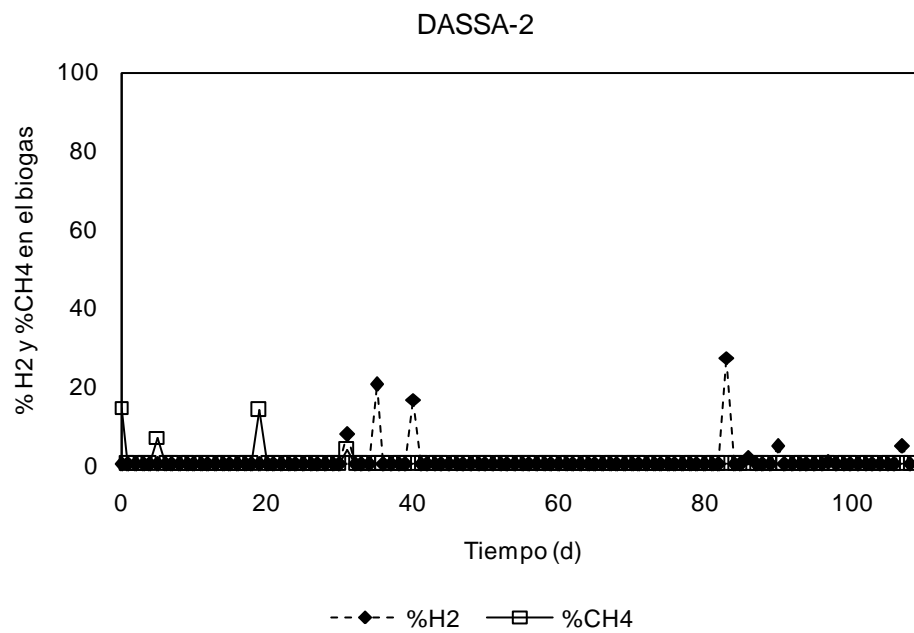


(b)

Figura B4. Producción acumulada de biogás y % de metano en: a) DASSM-7T y b) DASSM-8T

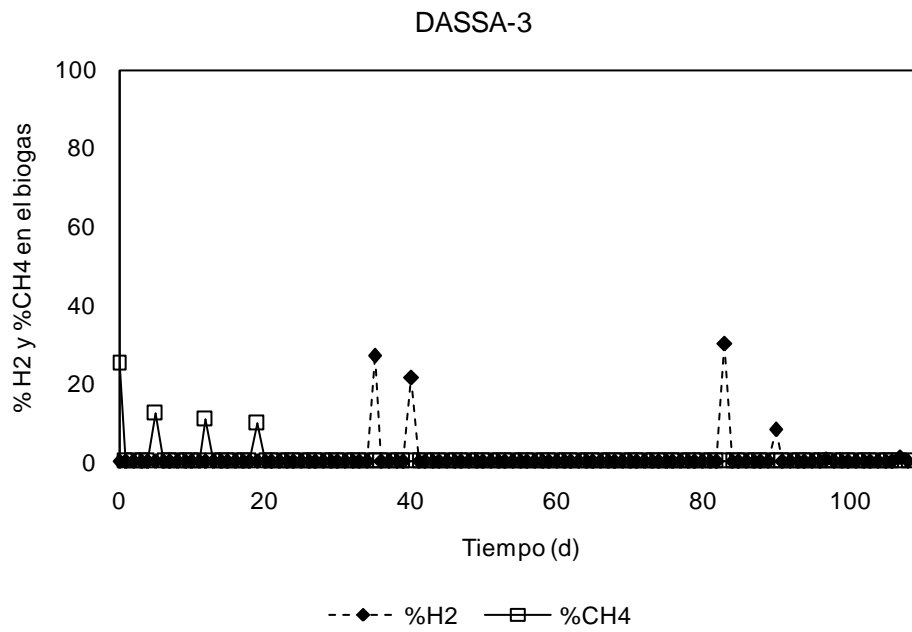
Anexo C. Comportamiento dinámico de los DASSA-M

(a)

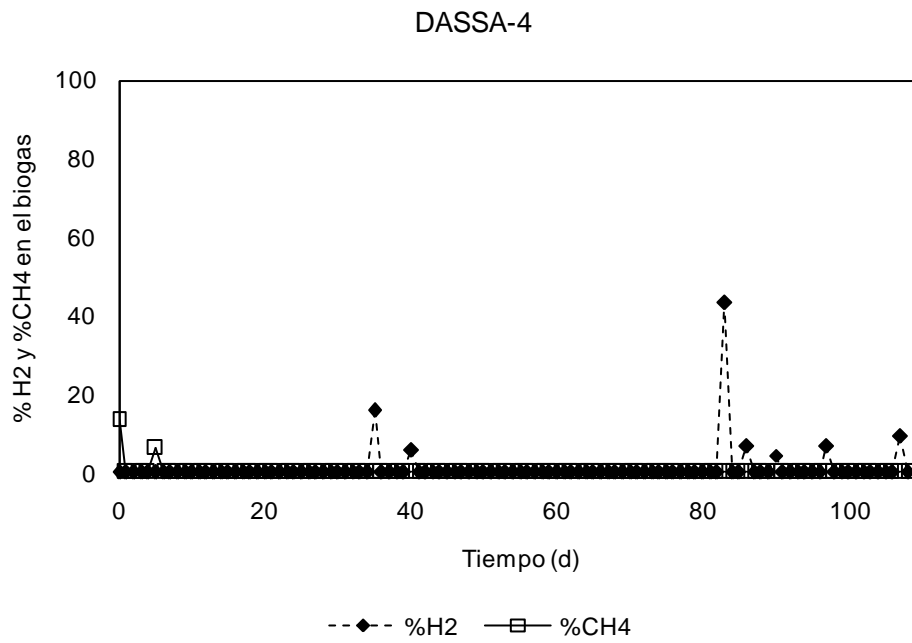


(b)

Figura C1. Porcentaje de hidrógeno y metano en el biogás producido en los DASSA-M: a) 1, b) 2.



(a)



(b)

Figura C2. Porcentaje de hidrógeno y metano en el biogás producido en los DASSA-M: a) 3, b) 4.

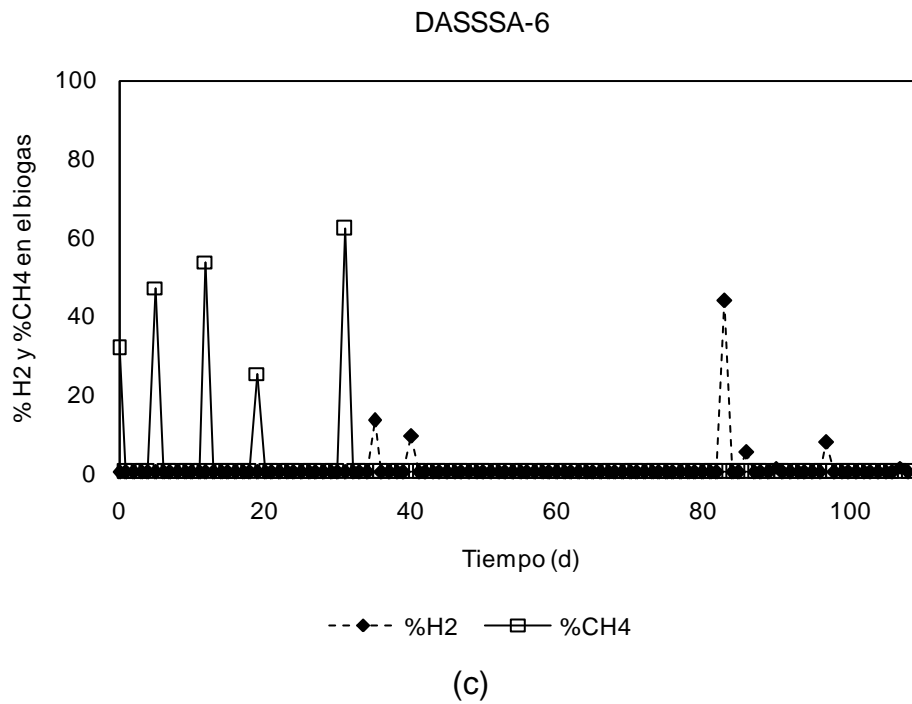
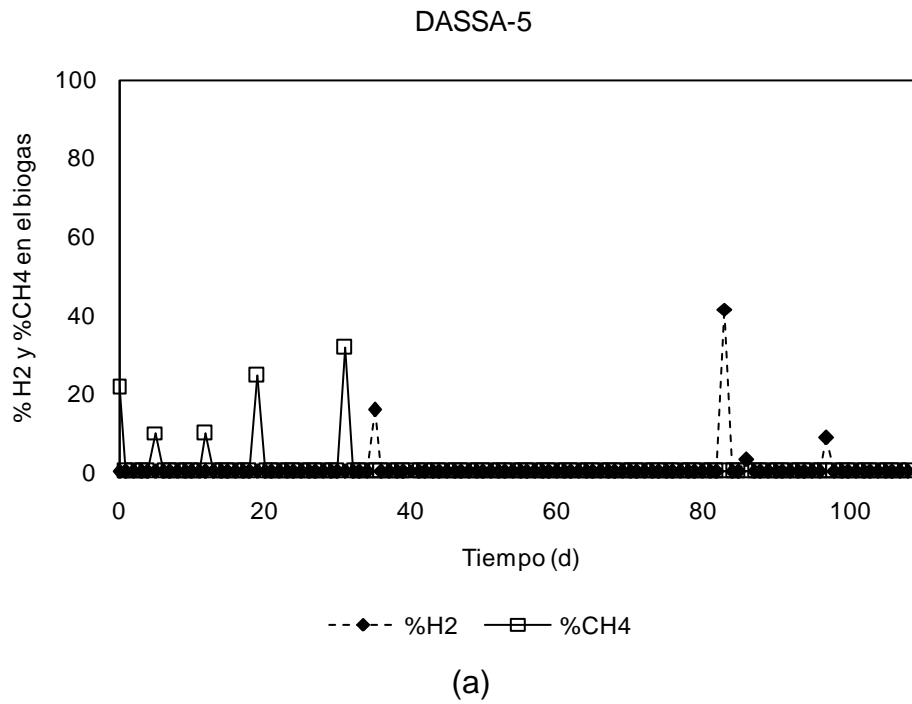


Figura C3. Porcentaje de hidrógeno y metano en el biogás producido en los DASSA-M: a) 5, b) 6.

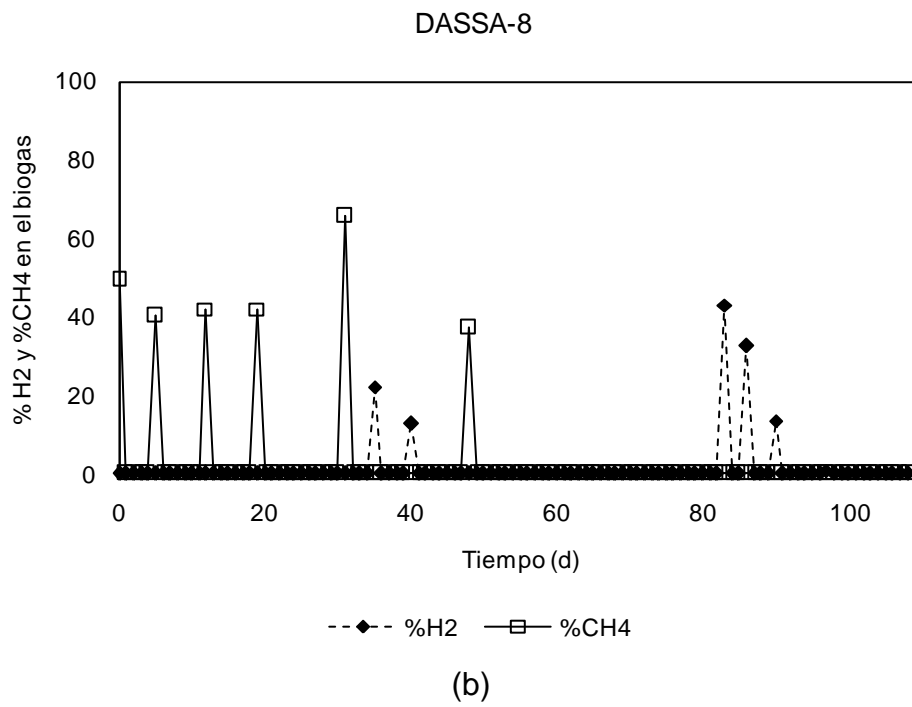
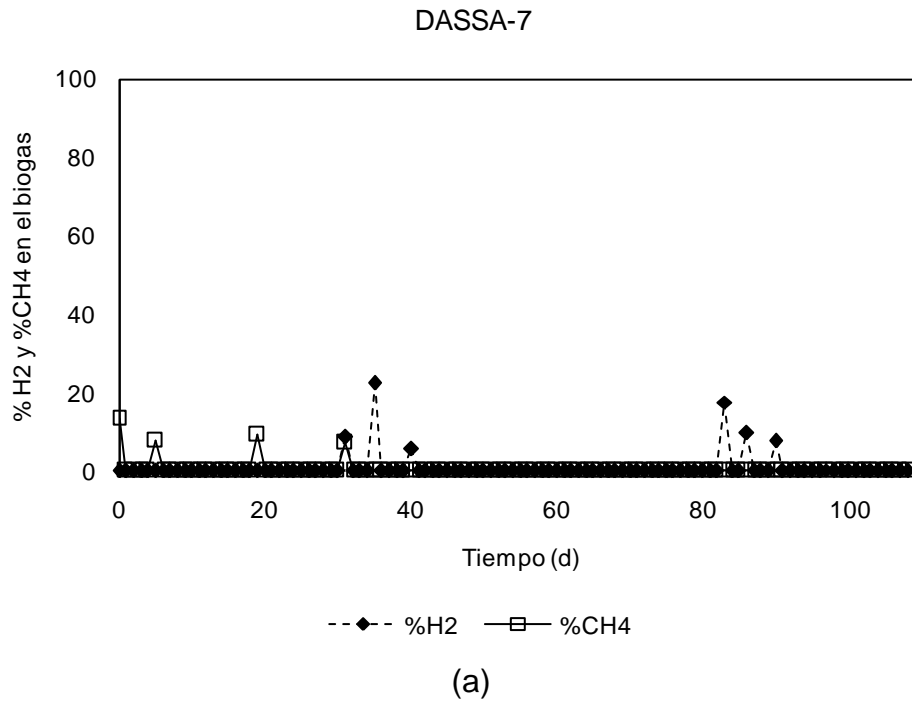


Figura C4. Porcentaje de hidrógeno y metano en el biogás producido en los DASSA-M: a) 7, b) 8.

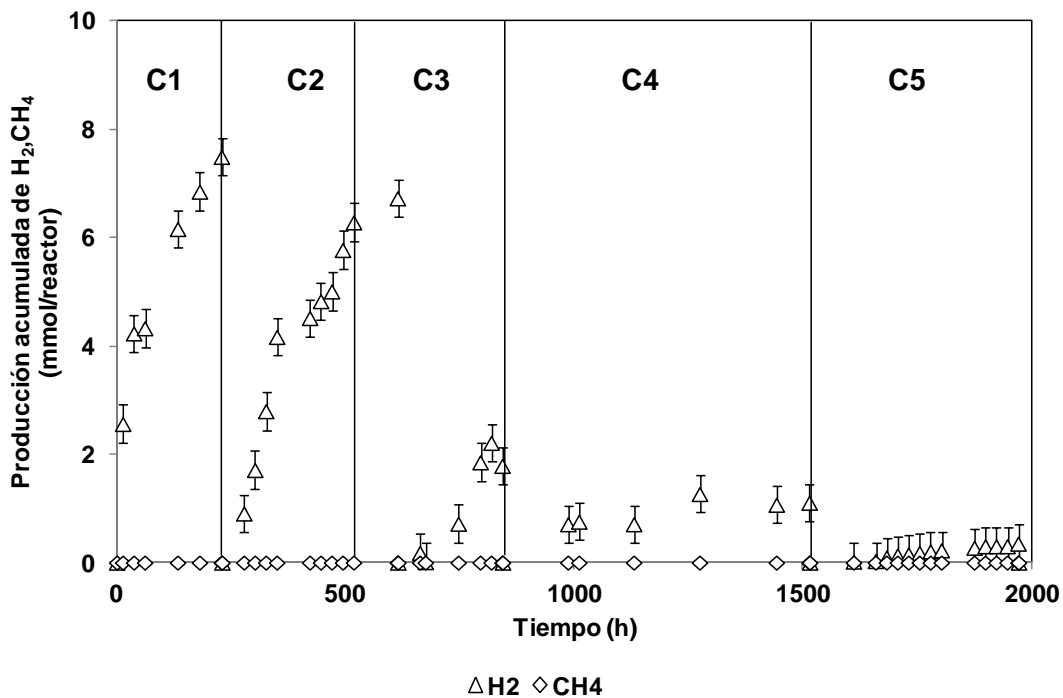
Anexo D. Comportamiento dinámico de la FASSH-VI (actividad 3c)

Figura D1. Producción acumulada de hidrógeno y metano del tratamiento 1 (ST: 18%, pH: 6.65; C:ciclo, cada ciclo inicia con gaseo con N₂)

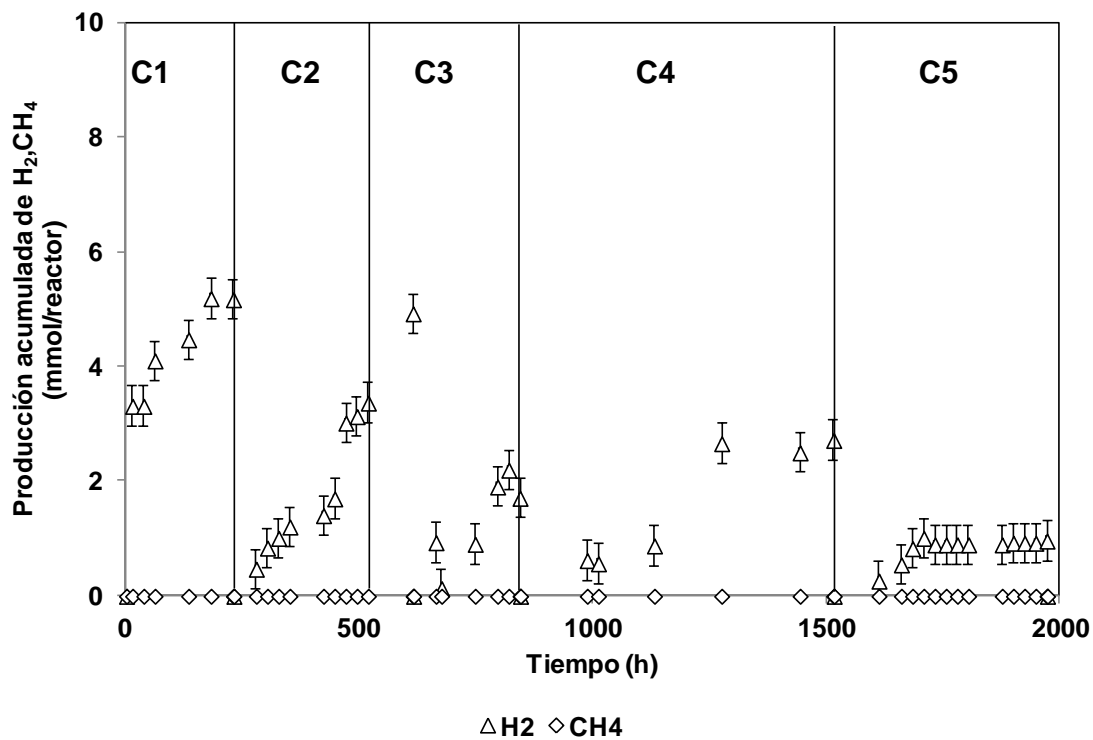


Figura D2. Producción acumulada de hidrógeno y metano del tratamiento 2 (ST: 32%, pH: 6.65; C:ciclo, cada ciclo inicia con gaseo con N₂)

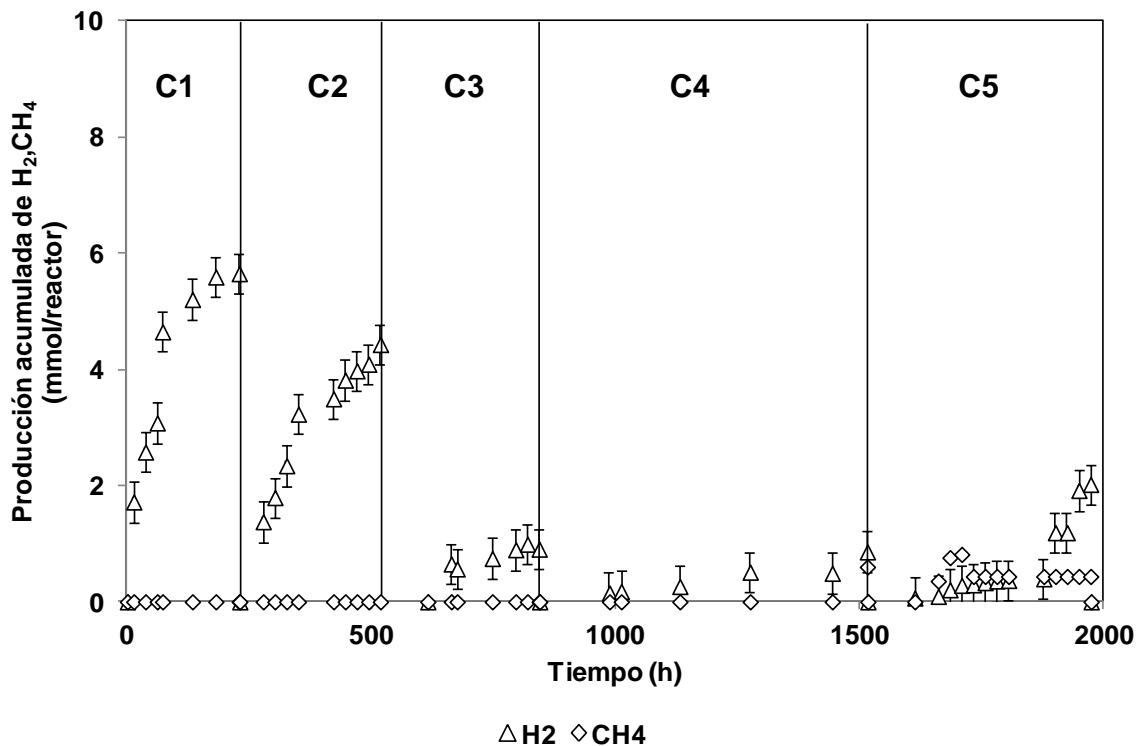


Figura D3. Producción acumulada de hidrógeno y metano del tratamiento 3 (ST: 18%, pH: 7.35; C:ciclo, cada ciclo inicia con gaseo con N_2)

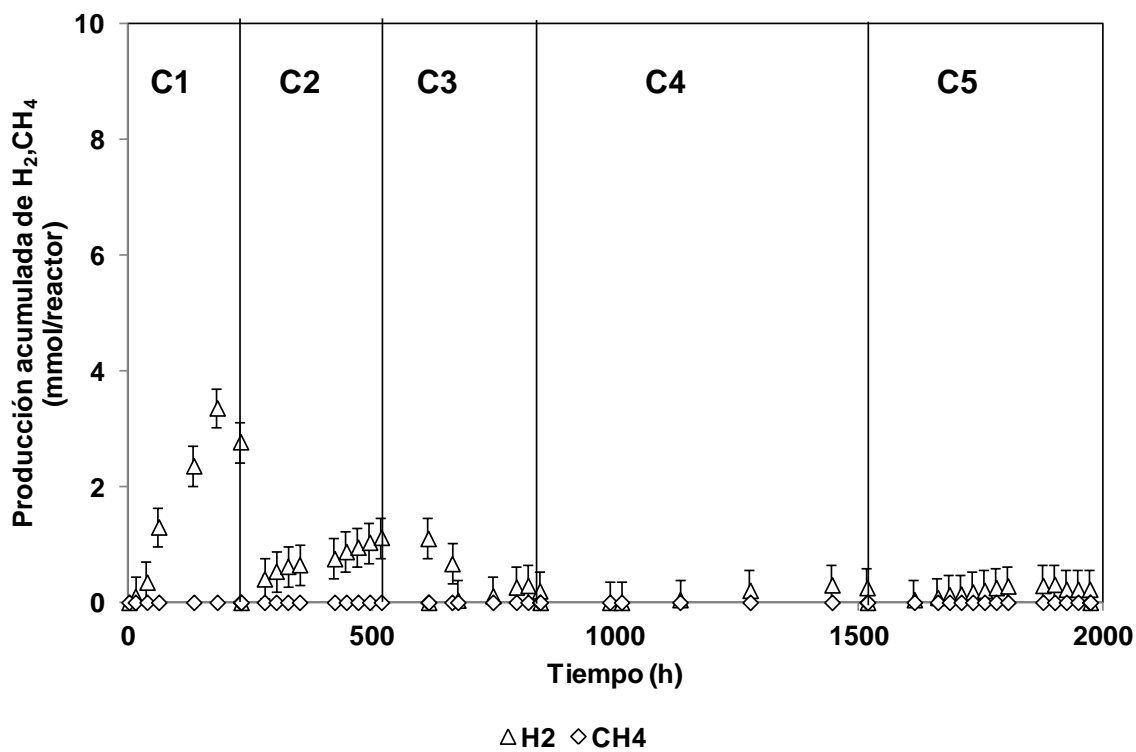


Figura D4. Producción acumulada de hidrógeno y metano del tratamiento 4 (ST: 32%, pH: 7.35; C:ciclo, cada ciclo inicia con gaseo con N_2)

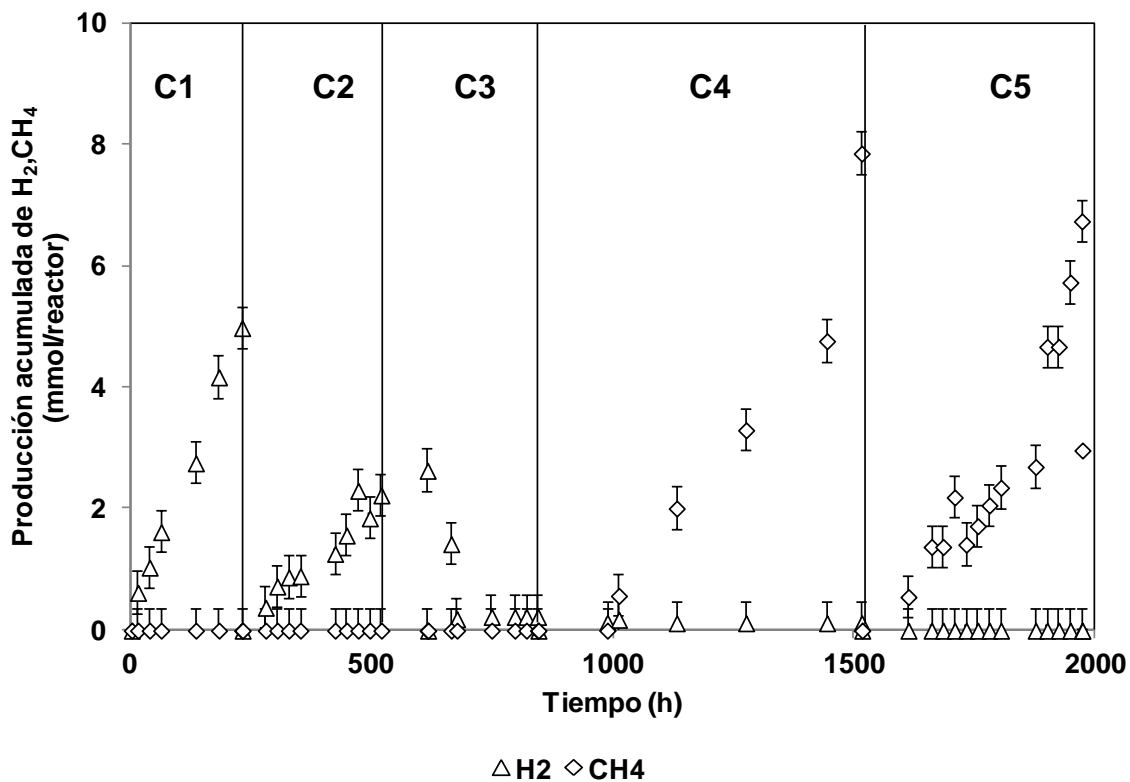


Figura D5. Producción acumulada de hidrógeno y metano del tratamiento 5 (ST: 15%, pH: 7.00; C:ciclo, cada ciclo inicia con gaseo con N₂)

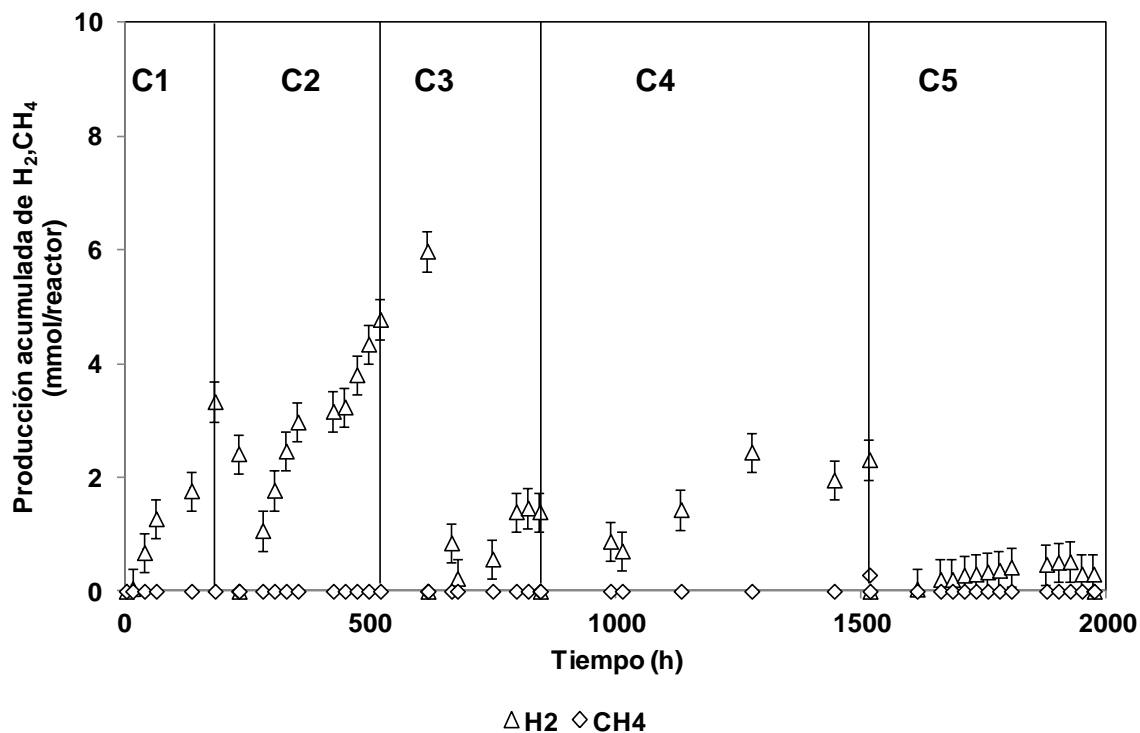


Figura D6. Producción acumulada de hidrógeno y metano del tratamiento 6 (ST: 35%, pH: 7.00; C:ciclo, cada ciclo inicia con gaseo con N₂)

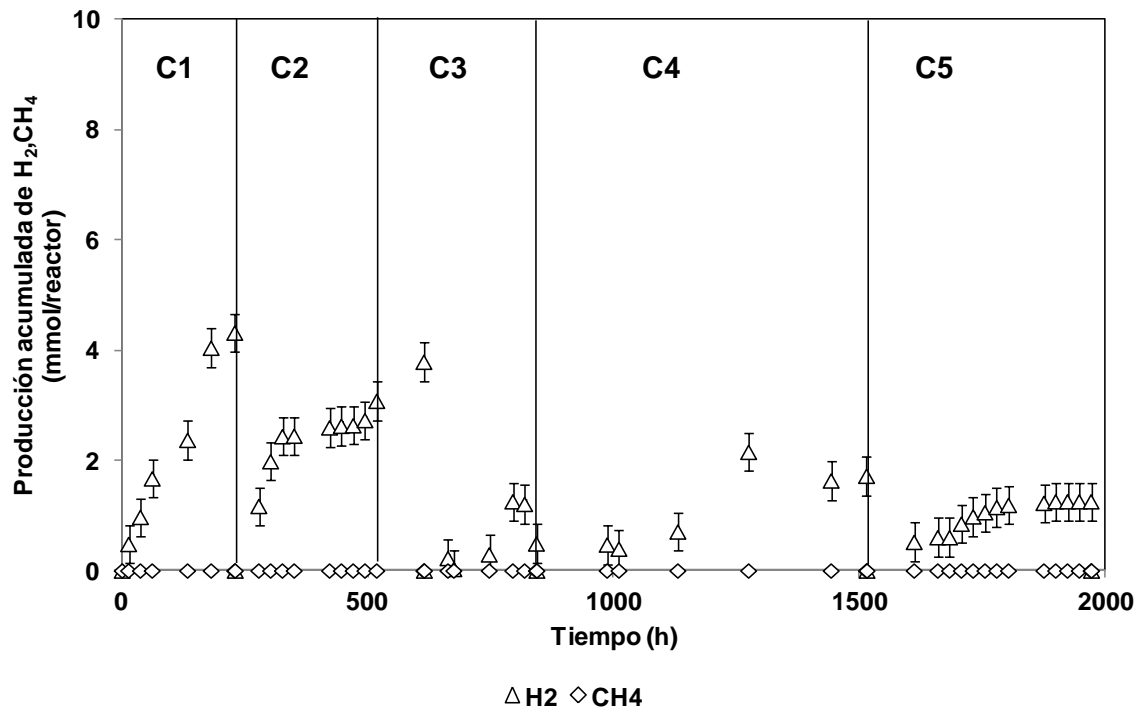


Figura D7. Producción acumulada de hidrógeno y metano del tratamiento 7 (ST: 25%, pH: 6.50; C:ciclo, cada ciclo inicia con gaseo con N_2)

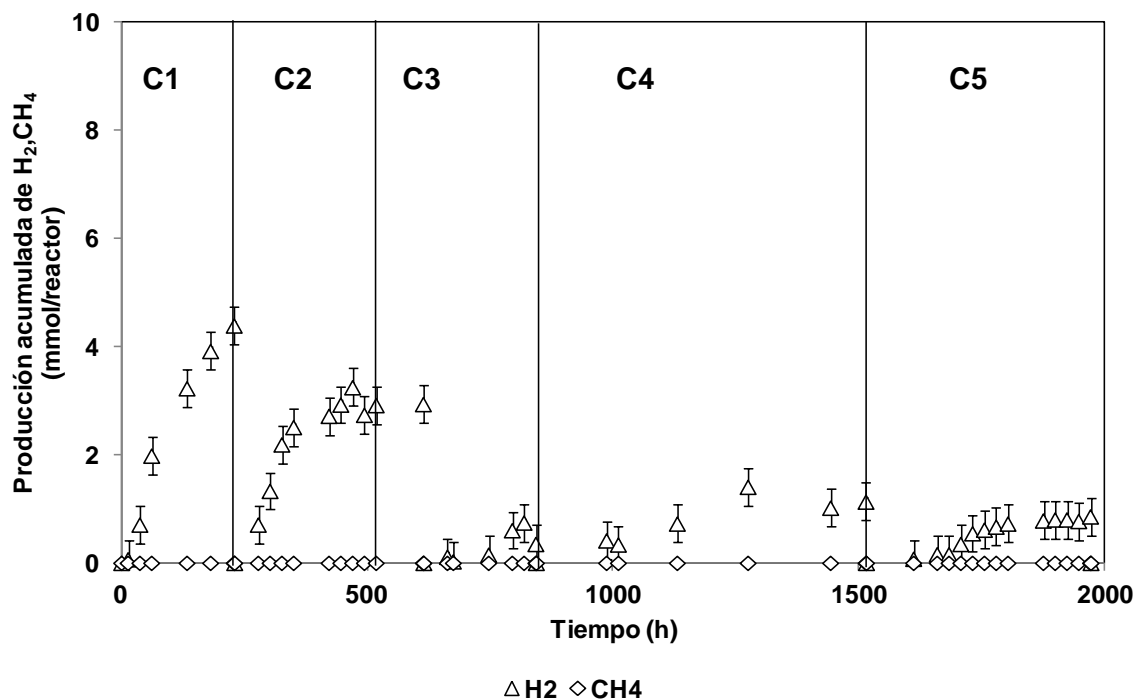


Figura D8. Producción acumulada de hidrógeno y metano del tratamiento 8 (ST: 25%, pH: 7.50; C:ciclo, cada ciclo inicia con gaseo con N_2)

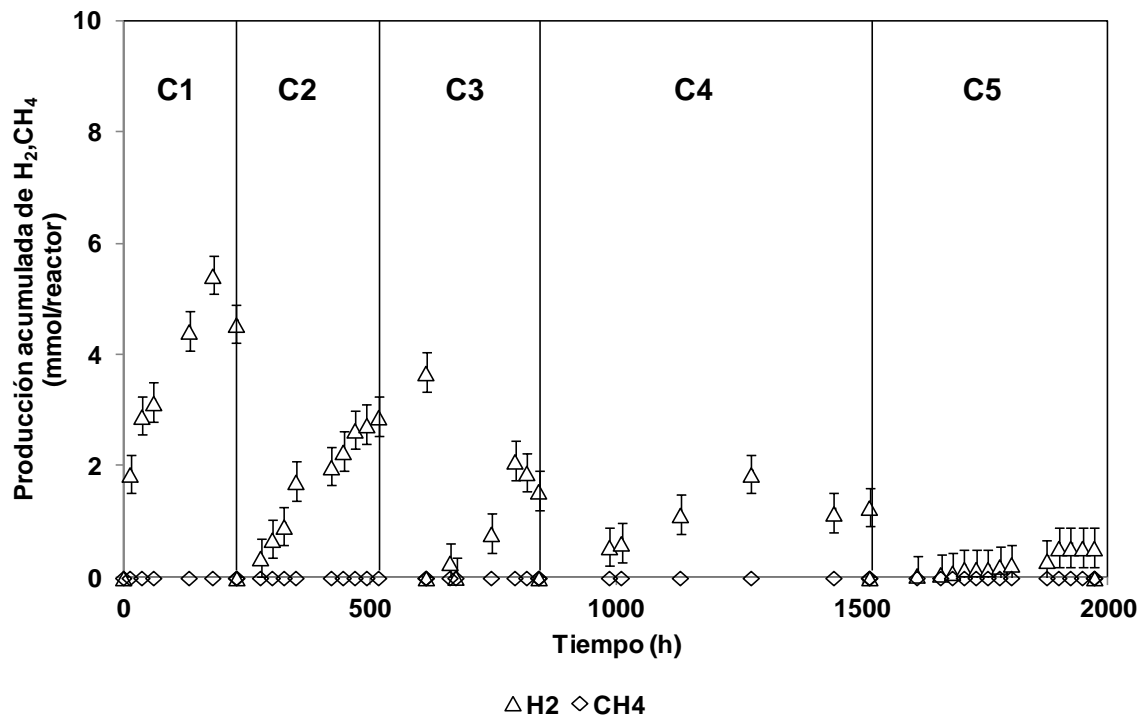


Figura D9. Producción acumulada de hidrógeno y metano del tratamiento 9 (ST: 25%, pH: 7.00; C:ciclo, cada ciclo inicia con gaseo con N₂)

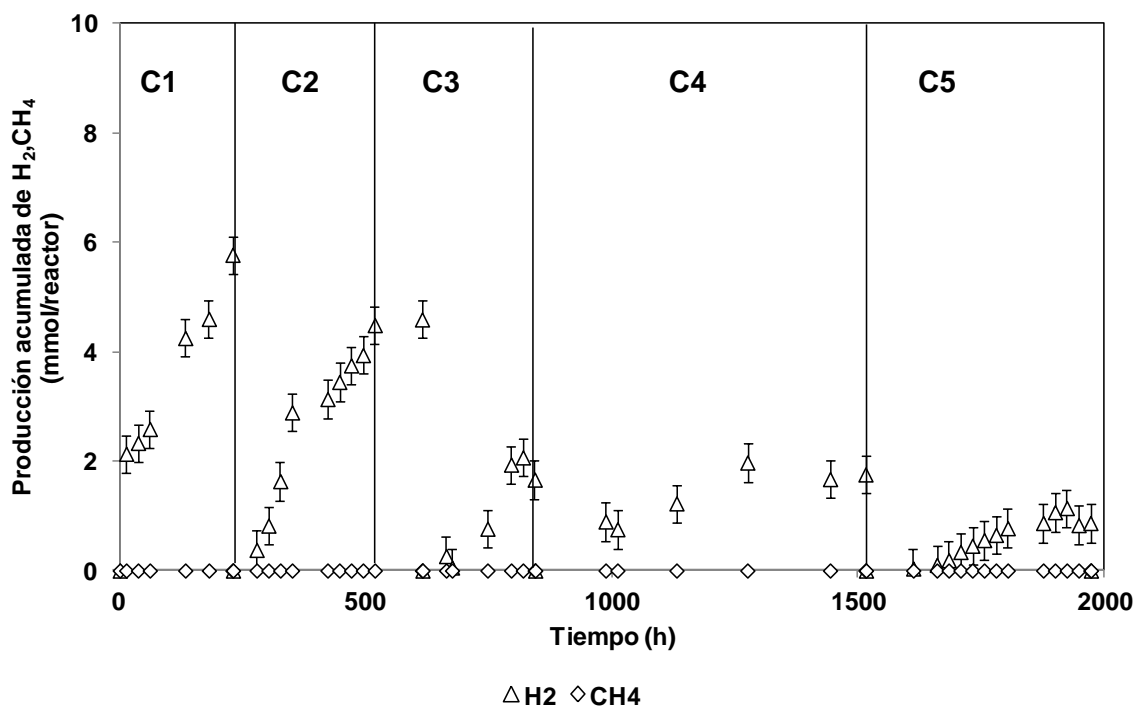


Figura D10. Producción acumulada de hidrógeno y metano del tratamiento 10 (ST: 25%, pH: 7.00; C:ciclo, cada ciclo inicia con gaseo con N₂)

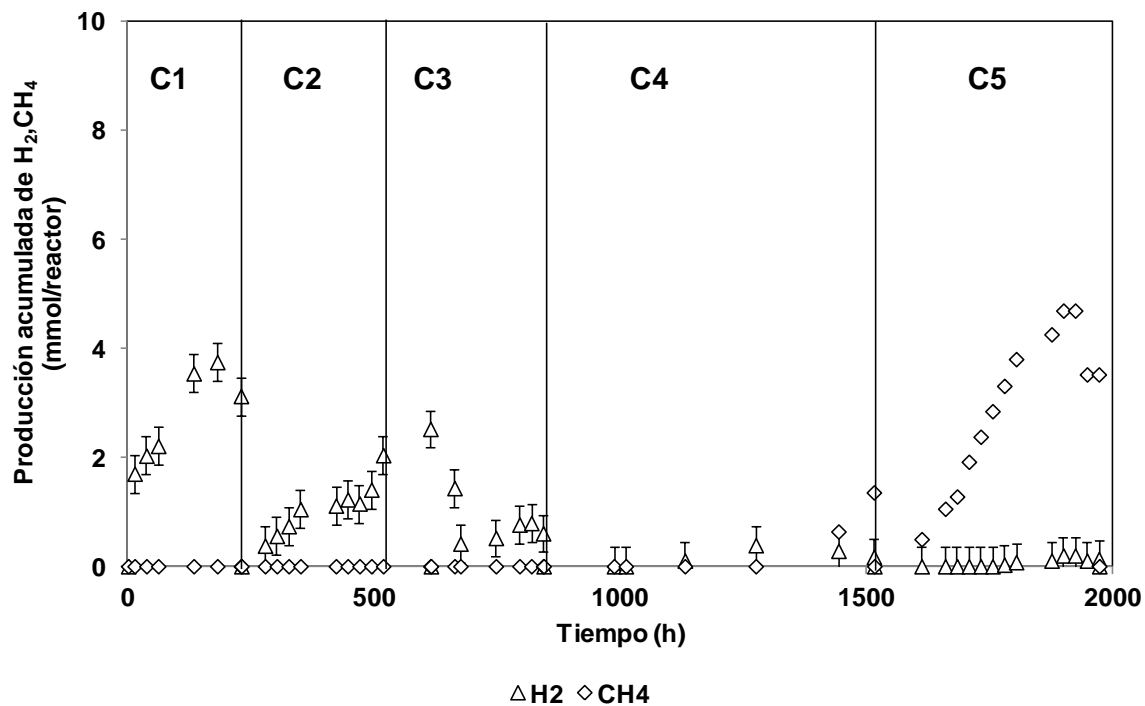


Figura D11. Producción acumulada de hidrógeno y metano del tratamiento 11 (ST: 25%, pH: 7.00; C:ciclo, cada ciclo inicia con gaseo con N_2)

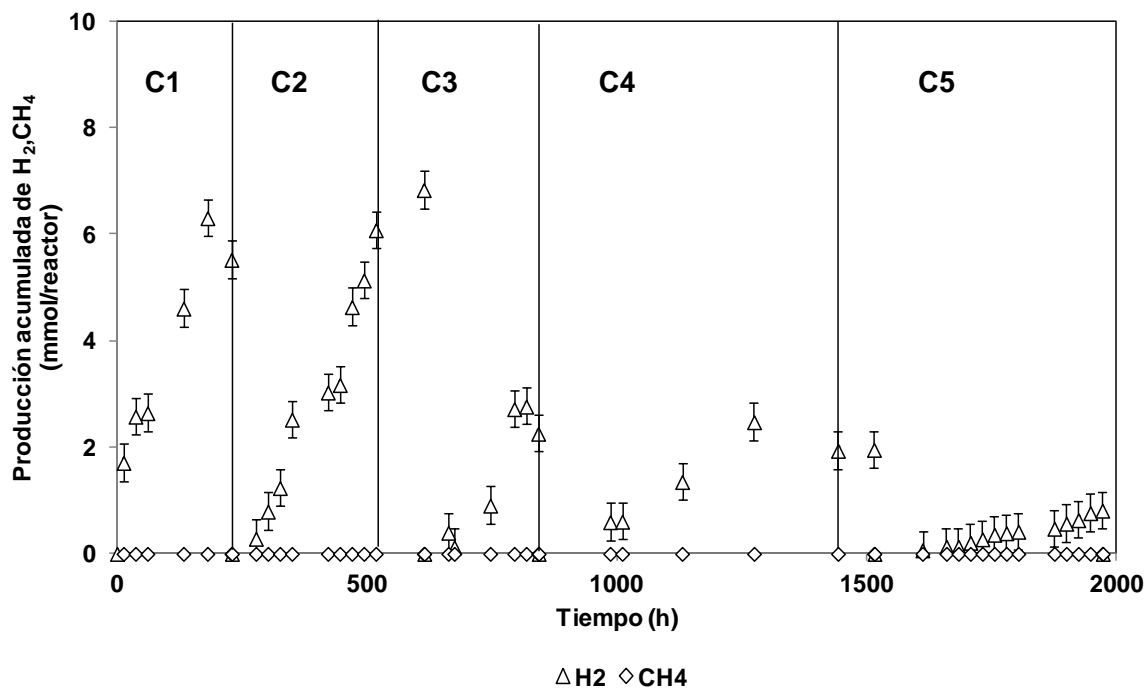


Figura D12. Producción acumulada de hidrógeno y metano del tratamiento 12 (ST: 25%, pH: 7.00; C:ciclo, cada ciclo inicia con gaseo con N_2)

Anexo E. Técnicas Analíticas

E1. Nitrógeno Total Kjeldahl

1-Discusión general

a) *Principio:* El nitrógeno de las muestras se digiere con ácido sulfúrico caliente más un agente catalítico que favorece la reacción convirtiendo todo el nitrógeno orgánico e inorgánico a nitrógeno amoniacal. El amonio se libera al agregar un álcali y destilar la muestra por arrastre de vapor en ácido bórico; con el cual forma los iones amonio y borato. La titulación se efectúa con ácido clorhídrico en forma indirecta proporciona el contenido de nitrógeno.

b) *Interferencias:* La presencia de nitratos o nitritos puede ser fuente de errores tanto positivos como negativos. Los nitratos o nitritos pueden reducirse en las condiciones del análisis del amonio, originándose resultados erróneamente altos. Estas sales también pueden descomponerse a la temperatura de mineralización dando como resultado una pérdida de nitrógeno en forma gaseosa y, por tanto, resultados erróneamente bajos. Materia orgánica, durante la digestión, el H_2SO_4 oxida la materia orgánica a CO_2 y H_2O . Si estuviera presente una gran cantidad de materia orgánica, se consume mucho ácido, aumentar la proporción de sal-ácido y aumentar la temperatura de digestión.

2-Instrumental.

Unidad de digestión microkjeldahl

Unidad de destilación microkjeldahl

3-Reactivos.

a) ácido sulfúrico concentrado

b) Catalizador ($HgO-K_2SO_4$).- Pesar 50 g de sulfato de potasio, adicionar 2 g de óxido de mercurio y mezclar hasta obtener un polvo completamente homogéneo.

c) Solución de NaOH 60%- Na_2SO_3 5%.- Disolver completamente 600 g de hidróxido de sodio en aproximadamente 600 ml de agua destilada, enseguida disolver 50 g de tiosulfato de sodio y aforar a 1000 ml.

d) H_3BO_3 5%(p/v).- Pesar 50 g de ácido bórico, disolverlos en agua destilada y aforar a 1000 ml.

e) HC1 0.01N.- 1 ml de ácido clorhídrico de 37.5% de pureza, diluirlo en agua destilada y aforar a 1000 ml. Normalizar con borato de sodio utilizando rojo de metilo como indicador.

f) Rojo de metilo 0.2%(p/v).- Disolver 200 mg de rojo de metilo en etanol absoluto y aforar a 100 ml.

g) Azul de metileno 0.2%(p/v).- Pesar 100 mg de azul de metileno y diluir en 50 ml de etanol absoluto.

h) Solución Indicadora (rojo de metilo-azul de metileno)- Mezclar 100 ml de solución alcohólica de rojo de metilo 0.2% con 50 ml de azul de metileno 0.2%

4- Procedimiento.

Pesar de 15-40 mg de muestra en un matraz microkjeldahl, adicionando 1 g de mezcla catalizadora y 2.5 ml de ácido sulfúrico, se pone a digerir la muestra en el equipo de digestión con extractor de vapores, hasta que clarifique manteniendo el calentamiento de 1.5 -2 horas y dejar enfriar. El residuo se disuelve en poca cantidad de agua destilada y transferir al tubo del destilador lavando el matraz de 2-3 veces con agua destilada.

En un matraz erlenmeyer se colocan 5 ml de la solución de -ácido bórico al 5% con 2 gotas de indicador en la terminal del condensador, cuidando que ésta quede dentro de la solución. El tubo con muestra se coloca en el destilador y se adicionan 10 ml de solución de hidróxido de sodio-tiosulfato de sodio. Se inicia la destilación por arrastre de vapor, colectando aproximadamente de 75-100 ml de destilado. Esta solución se titula -con ácido clorhídrico 0.01N hasta que vire el color del indicador de verde a violeta.

Para cada determinación se utiliza un blanco de reactivos -siguiendo el mismo procedimiento.

5-Cálculos.

$$\%N = \frac{(V2-V1) \cdot (eqN) \cdot (N) \cdot 100}{M} \quad [E1-1]$$

Donde:

%N = Porcentaje de nitrógeno total

V1 = Volumen de HC1 gastado en titular el blanco (ml)

V2 = Volumen de HC1 gastado en titular la muestra (ml)

eqN = 14.007

N = Normalidad de HC1 (0.01N)

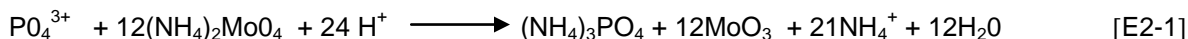
M = Peso de la muestra (mg)

6-Bibliografía. A.O.A.C. 14.003.1984. Official methods of analysis. 14th. Ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D C. U.S.A.

E2. Fósforo Total

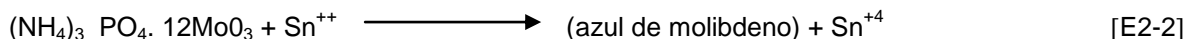
1-Discusión general

a) *Principio*: El ion fosfato se combina con el molibdato de amonio en condiciones acidas para formar un complejo conocido como fosfomolibdano de amonio



Cuando están presentes grandes cantidades de fosfato, el fosfomolibdato forma un precipitado amarillo que puede ser filtrado y usado para la determinación volumétrica. En concentraciones bajas se forma un sol amarillo que ha sido propuesto como base de la medida colorimétrica de concentraciones Intermedias. En concentraciones de fosfato inferiores a 10 mg/l, el color amarillo del sol coloidal no es perceptible y son necesarios otros medios para desarrollar el color.

El molibdato contenido en el fosfomolibdato de amonio es fácilmente reducido para producir un sol de color azul que es proporcional a la cantidad de fosfato presente. La reacción que se efectúa con el cloruro estanoso como agente reductor puede ser presentada de una manera cualitativa como sigue:



El compuesto colorido formado nunca ha sido aislado y su fórmula es desconocida, aunque se conoce como azul de molibdeno. Las muestras, cuyo contenido de fosfatos es mayor de 3 mg/l, pueden ser analizadas fácilmente tomando porciones pequeñas para el análisis y diluyendo al volumen apropiado

Si el cloruro estanoso ha estado en contacto con el aire para permitir una oxidación significativa de ion estanoso a ion estánico, una turbiedad se desarrolla en las muestras cuando se agrega al agente reductor, debido a la hidrólisis del SnCl_4 a $\text{Sn}(\text{OH})_4$ que precipita. Cualquier indicación de turbiedad debe crear duda de la calidad y efectividad del cloruro estanoso.

b) *Interferencias*: Interfieren en este método el color y la turbiedad, los cromatos y otros agentes fuertemente oxidantes como los peróxidos que decoloran fuertemente el complejo azul.

La interferencia del nitrito se puede eliminar adicionando 0.1 g de ácido sulfónico a la muestra antes de la adición del molibdato, no deben encontrarse arsénico ni germanio, los sulfuros se pueden eliminar por medio de una oxidación.

El hierro soluble no debe exceder de 0.04 mg en la porción que se tome para análisis. Se pueden tolerar 25 mg/l de silicatos solubles.

2-Instrumental

-Espectrofotómetro para usarse a 690 nm para soluciones acuosas

-Aspirador de Seguridad.

3-Reactivos

- 1) Indicador de fenolftaleína: Disolver 5 g de fenolftaleína en 500 ml de alcohol etílico o isopropionico al 95% y adicionar 500 ml de agua destilada. Si es necesario, adicionar gota a gota una solución de NaOH 0.02 N hasta que aparezca un color rosa tenue.
- 2) Solución de molibdato de amonio (I): Disolver 25 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 175 ml de agua destilada; con precaución agregar 280 ml de H_2SO_4 concentrado a 400 ml de agua destilada. Enfríe y agréguese la solución de molibdato, diluyendo la mezcla a un litro.
- 3) Solución ácido concentrada: Se vierten lentamente 300 ml de H_2SO_4 concentrado a unos 600 ml de agua destilada, se enfría la solución, se agregan 4 ml de HNO_3 concentrado y se diluye a un litro.
- 4) Solución de cloruro estanoso (I). Disuelva 2.5 g de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de glicerina, caliente a baño maría y agite para acelerar la disolución, este reactivo, es estable y no requiere preservación ni almacenamiento especial.
- 5) Solución patrón de fosfatos: Disuelva 219.5 mg de fosfato monopotásico anhidro KH_2PO_4 secado en estufa a 105°C , en agua destilada y diluya a 1000 ml; 1 ml = 0.05 mg de P como P_2O_5 .

Reactivos para la extracción:

- 6) Disolvente benceno – isobutanol: Mezcle volúmenes iguales de benceno y alcohol isobutilico (Precaución: este solvente es altamente inflamable)
- 7) Solución diluida de molibdato de amonio (II). Disuelva 40.1 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 500 ml aproximadamente de agua destilada. Agregue lentamente 396 ml de reactivo de molibdato (I), enfríe y diluya a un litro.
- 8) Solución ácido sulfúrico-alcohólica. Agregue cuidadosamente 20 ml de H_2SO_4 concentrado a 980 ml de alcohol metílico, agitando continuamente.
- 9) Solución diluida de cloruro estanoso (II). Mezcle 8 ml del reactivo de cloruro estanoso (I) con 50 ml de glicerina, este reactivo es estable por lo menos 6 meses.

4-Procedimiento.

Tratamiento preliminar de la muestra.

Pesar de 2 a 3 gr de muestra en balanza analítica, secar en estufa a 80°C para evitar proyecciones por aproximadamente 2 horas, incinerar en una mufla a 550°C por 12 horas, colocar las cenizas en un matraz Erlenmeyer y adicionar 5 ml de la solución de digestión acida más 80 ml de agua destilada. Agregar al matraz 0.8 g de persulfato de potasio y mezclar. Digerir en autoclave o en parrilla hasta que el volumen llegue a 50 ml, dejar enfriar el matraz alrededor de 15 minutos y agitar vigorosamente. Filtrar la solución con papel filtro y a la cantidad de solución obtenida adicionar agua destilada hasta completar 100 ml, adicionar una gota del indicador de fenolftaleína.

Desarrollo del color

Adicionar, 4 ml del reactivo de molibdato (I) y 0.5 ml (10 gotas) del reactivo de cloruro estanoso (II) y agitar después de haber sido vertidos estos reactivos. desarrollado y la intensidad de color dependen de la temperatura que -tenga la solución final. Cada grado centígrado incrementa la producción de color aproximadamente en un 1 % . La temperatura debe estar entre 20 y 30°C y la temperatura entre los patrones y las muestras -no debe variar más de 2°C entre cada uno de estos.

Medición de color

Después de 10 minutos pero antes de 12, medir el color a 690 nm comparando con una curva de calibración, usando un blanco con agua destilada en vez de muestra y siguiendo todos los pasos involucrados en la prueba.

Extracción (opcional)

Cuando se desee incrementar la sensibilidad o eliminar interferencias, se toman 40 ml de la muestra o una alícuota diluida a 40 ml en un embudo de separación. Adicionar 50 ml del solvente benceno-isobutanol y 15 ml del reactivo de molibdato II.

Tape y agite vigorosamente por 15 segundos exactamente. Cualquier demora aumenta la cantidad de polifosfatos si están presentes, la cual será incluida en el valor de ortofosfatos.

Elimine la capa acuosa (inferior), remueva el tapón y tome 25.0 ml de la capa orgánica separada (superior), usando una pipeta y un aspirador de seguridad. Pase a un matraz volumétrico de 50 ml, agregue de 15 a 16 ml de la solución ácido sulfúrico-alcohólica agite, agregue 10 gotas del reactivo de cloruro estanoso diluido (II), agite y diluya hasta la marca con ácido sulfúrico alcohólico. Mezcle cuidadosamente; después de 10 minutos, pero antes de 30 minutos, lea contra el testigo a 690 nm.

Prepare el testigo llevando a 40 ml de agua destilada por el mismo procedimiento que la muestra. Lea la concentración de PO_4^{3-} en la curva de calibración preparada llevan -do patrones conocidos de fosfatos por los mismos pasos, que las muestras.

5-Curva patrón

Prepare una serie de patrones de 10 ml agregando los volúmenes siguientes de la solución patrón de KH_2PO_4 : 0.0, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 7.00 y 10 ml. Use microbureta de 10 ml graduada en 0.05 ml para medir las cantidades antes mencionadas. Agregue los mismos reactivos y en las mismas cantidades que para las muestras. Prepare un testigo con agua destilada y los mismos reactivos. Lea la absorbancia a a 690 nm de longitud de onda. Grafique la concentración conocida de cada uno de los patrones con respecto al valor de absorbancia obtenido.

6-Referencias

APHA, AWWA, WPCF. Standard Methods for the examination of Wate and Wastewater, 13th Edition 1971.

Clair N. Sawyer y Perry L McCarty, Chemistry for Sanitary Engineers Mcgraw Hill Book Kogakusha 1907.

E3. Azúcares Reductores, Método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

1-Discusión general

a) Principio: Se basa en la capacidad que tiene la glucosa de oxidarse y reducir el ácido 3,5-dinitrosalicílico en condiciones alcalinas. Esta reducción se evidencia por la producción de una coloración amarilla que se hace más intensa a medida que aumenta la concentración de azúcares reductores, razón por la cual esta técnica se encuentra dentro de las denominadas técnicas colorimétricas al presentar un color amarillo (Miller, 1959). La concentración se determina mediante la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro de acuerdo con la ley de Lambert – Beer a 550 nm.

b) Interferencias: no funciona con azúcares no reductores como la sacarosa (Azúcar).

2-Instrumental

Agitador Vortex

Cámara de extracción

Cuba de ebullición

Espectrofotómetro UV-VIS que pueda leer a 550 nm

3-Reactivos

-Reactivo DNS: A 14.16 ml de Agua destilada agregar 10.6 gr de ácido 3,5-Dinitrosalicílico, junto con 19.8 gr de NaOH, homogenizar y agregar 306 gr de Tartrato de sodio y potasio, posteriormente adicionar 7.6 ml de fenol y 8.3 g de metabisulfito de sodio, homogenizar y aforar a 1 L con agua destilada.

-Solución de Glucosa 0.1 %: tomar 0.1 gr de glucosa y disolverlos en 100ml de agua destilada y homogenizar

4-Procedimiento

-Tratamiento de la muestra: se debe hacer una dilución 1:20, es decir se toma un gramo de la muestra problema y se diluye en 20 ml de agua destilada y se homogeniza.

-Generación de color: De la dilución 1: 20, se toma 1 ml y se coloca en un tubo de ensaye, se le agregan 3 ml del reactivo DNS, desde el inicio se debe de contar con un blanco, utilizando agua destilada en lugar de la sustancia problema, se procede a agitarse en el vortex y se coloca en una cuba de ebullición por 5 minutos, pasado este tiempo se sacan de la cuba y se dejan enfriar a temperatura ambiente, aproximadamente por 15 minutos, se agregan 6 ml de agua destilada, se mezclan en el vortex y se procede a leer la absorbancia a 550 nm.

5-Curva tipo

Con la solución de glucosa al 0.1 %, se hacen los patrones de la siguiente tabla.

μl glucosa 0.1 %	100	200	300	400	600	800	1000
μl agua destilada	900	800	700	600	400	200	0

Posteriormente, tratar los puntos con el mismo procedimiento que para las muestras problema y leyéndose a 550 nm

6-Referencia

Miller G, L., (1959). Use of Dinitrilyalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry.31, 426-428

E4. Determinación de sólidos

1-Discusión general.

Principio: Los sólidos totales incluyen los sólidos en suspensión y en disolución. Los sólidos volátiles se determinan tras la ignición de la muestra; este paso no solo provoca pérdidas en materia orgánica, sino que también se descomponen o volatilizan sales minerales.

2-Instrumental

Cápsulas de porcelana

Estufa a 105°C

Mufla a 550°C

Desecador

3-Procedimiento

a).- Sólidos totales (ST)

Pesar una cápsula de porcelana previamente mantenida en la estufa a peso constante (C)

Tomar (10 mg) de muestra y poner en la cápsula, se dejar secar hasta tener un peso constante a 103 - 105 °C (o bien a 550°C por 5 horas), Pasar a un desecador, enfriar y pesar, calcular el peso de los sólidos contenidos en la muestra por diferencia entre el peso de la cápsula al sacarla de la estufa y el peso que tenía vacía (CE-C)

b).- Sólidos volátiles (SV)

Llevar la cápsula donde se determinaron los sólidos totales a la mufla (550 °C) durante dos horas, sacar a un desecador y dejar enfriar y posteriormente pesar (CM), calcular por diferencia el peso de los sólidos volátiles contenidos en la muestra (CE - CM)

SV= CE-CM

[E4-1]

4-Referencia

NMX-AA-034-SCFI-2001. Análisis de agua - determinación de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas-Método de prueba

APHA, AWWA, WPCF. Standard Methods for the examination of Wate and Wastewater, 13th Edition 1971.

E5. Determinación de capacidad de retención de agua

1-Discusión general.

Principio: La capacidad de retención de agua (CRA) es el intervalo de humedad que se define como el agua que puede ser absorbida a un ritmo adecuado para permitir el crecimiento normal de organismos y microorganismos. La CRA es un parámetro físico-químico importante, los cambios en la CRA afectan al agua que se denomina "inmovilizada" y no tienen ninguna relación con el "agua de constitución" ni con el "agua de interfase", La CRA se supone es causada por una inmovilización de agua en las fibras de los residuos por una acción capilar que es generada por pequeños poros o capilares.

2-Instrumental

Vaso de precipitado de 2000 mL

Espátula

Papel filtro

Balanza

Embudo

Papel aluminio

Matraz erlen-meyer

Probeta

3-Procedimiento

- a).- se pesa una cantidad conocida de la muestra problema y se lleva a peso seco
- b).- se agrega una cantidad de agua conocida a la muestra seca y se mezcla perfectamente bien hasta que el agua queda absorbida completamente
- c).- se coloca en la balanza el papel filtro y se registra su peso, posterior a eso se coloca la muestra húmeda y se registra el peso.
- d).- se coloca el papel filtro junto con la muestra húmeda en el embudo, el embudo se coloca en un matraz y se tapa con papel aluminio y se deja por 12 horas a que escurra el agua.
- e).- se pesa la muestra después de 12 horas y se registra el peso
- f).- se calcula de la siguiente manera:

1. si la muestra se seca y se lleva a saturación:

$$1.1. H_m; W_m \xrightarrow{\text{secado}} W_s \xrightarrow{\text{hidratación}} W_{mh}; H_{sat} \quad [E5-1]$$

$$1.2. CRA = \frac{(W_{mh} - \text{tara} - W_s)}{W_s} * 100; \frac{g_{\text{agua}}}{g_{\text{sustrato seco}}} * 100 \quad [E5-2]$$

2. si la muestra se toma como viene

$$2.1. H_m, ST_m; CRA = \frac{[W_{mh} - \text{tara} - W_m(1 - \frac{H_m(\%) }{100})]}{W_m(1 - \frac{H_m(\%) }{100})} * 100 = w_{mh} - \text{tara} - W_m + \frac{W_m H_m(\%) }{100} \quad [E5-3]$$

3. si se conoce la humedad y la cantidad de sólidos totales

$$3.1. W_s = W_m \left(1 - \frac{H\%}{100}\right) = W_m \left(\frac{ST\%}{100}\right) \quad [E5-4]$$

$$3.2. CRA = \frac{W_{mh-tara} - W_m \left(\frac{ST_m\%}{100}\right)}{W_m \left(\frac{ST\%}{100}\right)} \quad [E5-5]$$

4-Referencia

Gupta, S.C., Larson, W.E. (1979). Estimating soil water retention characteristics from particle size distribution, organic matter percent, and bulk density. *Water Resources Research*. 15 (6): 1633-1635.

Anexo F. Memorias de cálculos

F1. Cálculo de producción de hidrógeno extra por FF

Se considera el mejor resultado de FASSH-VI que es a 18% de ST

$$3.03 \frac{\text{mmolH}_2}{\text{gss}} * \frac{1000\text{g}}{1\text{Kg}} = 3030 \text{mmolH}_2/\text{Kgss}$$

Para FF empleando los resultados para G3

$$11.09 \frac{\text{mmolH}_2}{L_{\text{ext dil}}}$$

La cantidad de extracto es de 13.5L el cual se diluye 1:10, por lo tanto se obtuvo un total de 135L de extracto diluido.

La FORSA tiene 81% de ST, la FORSA se acondiciono a 18% de ST

Producción de H₂/kgss en FF empleando los resultados de G3:

$$P_{H_2,FF} = \frac{11.09 \text{ mmolH}_2}{L_{\text{ext dil}}} * \frac{135 L_{\text{ext dil}}}{\text{KgFA}} * \frac{1 \text{KgFA}}{0.81 \text{KgFORSA seca}} = 1848.33 \frac{\text{mmolH}_2}{\text{Kgss}} \quad [\text{F1-1}]$$

Para FF empleando los resultados para Rp

$$11.81 \frac{\text{mmolH}_2}{L_{\text{ext dil}}}$$

Producción de H₂/kgss en FF empleando los resultados para Rp

$$P_{H_2,FF} = \frac{11.81 \text{ mmolH}_2}{L_{\text{ext dil}}} * \frac{135 L_{\text{ext dil}}}{\text{KgFA}} * \frac{1 \text{KgFA}}{0.81 \text{KgFORSA seca}} = 1968.33 \frac{\text{mmolH}_2}{\text{Kgss}} \quad [\text{F1-2}]$$

Para la FO + FF empleando en FF a G3

$$3.03 \frac{\text{molH}_2}{\text{Kgss}} + 1.85 \frac{\text{molH}_2}{\text{Kgss}} = 4.88 \frac{\text{molH}_2}{\text{Kgss}} \quad [\text{F1-3}]$$

Para la FO + FF empleando en FF a Rp

$$3.03 \frac{\text{molH}_2}{\text{Kgss}} + 1.97 \frac{\text{molH}_2}{\text{Kgss}} = 5.00 \frac{\text{molH}_2}{\text{Kgss}} \quad [\text{F1-4}]$$

Para expresar los resultados por molHex suponemos que 1Kg de sustrato seco del residuo agroindustrial tiene 65% de celulosa y hemicelulosa (C+H) y que su peso molecular es 180, por lo tanto 1Kg(C+H) tiene 5.7 mol de hexosa.

Para la FO

$$3.03 \frac{\text{molH}_2}{\text{Kgss}} * \frac{1\text{Kgss}}{0.65\text{Kg(C+H)}} * \frac{1\text{Kg(C+H)}}{5.7\text{molHex}} = 0.82 \frac{\text{molH}_2}{\text{molHex}} \quad [\text{F1-5}]$$

Para la FF empleando en FF a G3

$$1.85 \frac{\text{molH}_2}{\text{Kgss}} * \frac{1\text{Kgss}}{0.65\text{Kg(C+H)}} * \frac{1\text{Kg(C+H)}}{5.7\text{molHex}} = 0.50 \frac{\text{molH}_2}{\text{molHex}} \quad [\text{F1-6}]$$

Para la FO + FF empleando en FF a G3

$$3.03 \frac{\text{molH}_2}{\text{Kgss}} + 1.85 \frac{\text{molH}_2}{\text{Kgss}} = 4.88 \frac{\text{molH}_2}{\text{Kgss}} * \frac{1\text{Kgss}}{0.65\text{Kg(C+H)}} * \frac{1\text{Kg(C+H)}}{5.7\text{molHex}} = 1.32 \frac{\text{molH}_2}{\text{molHex}} \quad [\text{F1-7}]$$

o

$$0.82 \frac{\text{molH}_2}{\text{molHex}} + 0.50 \frac{\text{molH}_2}{\text{molHex}} = 1.32 \frac{\text{molH}_2}{\text{molHex}} \quad [\text{F1-8}]$$

Para la FF empleando en FF a Rp

$$1.97 \frac{\text{molH}_2}{\text{Kgss}} * \frac{1\text{Kgss}}{0.65\text{Kg(C+H)}} * \frac{1\text{Kg(C+H)}}{5.7\text{molHex}} = 0.53 \frac{\text{molH}_2}{\text{molHex}} \quad [\text{F1-9}]$$

Para la FO + FF empleando en FF a Rp

$$3.03 \frac{\text{molH}_2}{\text{Kgss}} + 1.97 \frac{\text{molH}_2}{\text{Kgss}} = 5.00 \frac{\text{molH}_2}{\text{Kgss}} * \frac{1\text{Kgss}}{0.65\text{Kg(C+H)}} * \frac{1\text{Kg(C+H)}}{5.7\text{molHex}} = 1.35 \frac{\text{molH}_2}{\text{molHex}} \quad [\text{F1-10}]$$

o

$$0.82 \frac{\text{molH}_2}{\text{molHex}} + 0.53 \frac{\text{molH}_2}{\text{molHex}} = 1.35 \frac{\text{molH}_2}{\text{molHex}} \quad [\text{F1-11}]$$

Tabla compiladora de resultados de producción de hidrógeno en proceso en una y dos etapas

FO	FF		Proceso en 2 etapas
	Rp	G3	
3.03 (molH ₂ /Kgss)	1.97 (molH ₂ /Kgss)	1.85 (molH ₂ /Kgss)	5.00 (molH ₂ /Kgss) 4.88 (molH ₂ /Kgss)
0.82 (molH ₂ /molHex)	0.53 (molH ₂ /molHex)	0.50 (molH ₂ /molHex)	1.35 (molH ₂ /molHex) 1.32 (molH ₂ /molHex)

F2. Cálculo de balance energético de DASSA-M y DASSA-T

Balance global de energía para un sistema de flujo en estado estacionario (Geankoplis, 2009)

$$q = \sum H_p - \sum H_R + \Delta H_{298} \quad [\text{F2-1}]$$

donde:

$\sum H_p$ = Entalpia de los productos en termofilia y mesofilia

$\sum H_R$ = Entalpia de los materiales del proceso

ΔH_{298} = Entalpia del agua

$$\sum H_p = \dot{m}_{H_2,T}HT - \dot{m}_{H_2,M}HM \quad [\text{F2-2}]$$

donde:

$\dot{m}_{H_2,T}HT$ = Entalpia en régimen termofílico

$\dot{m}_{H_2,M}HM$ = Entalpia en régimen mesofílico

$$\sum H_p = (\dot{m}_{H_2,T} - \dot{m}_{H_2,M})(HT - HM) \quad [\text{F2-3}]$$

$$\sum H_p = (\dot{m}_{H_2,T} - \dot{m}_{H_2,M})(\Delta H_{\text{combustión}}) \quad [\text{F2-4}]$$

$$q_1 = mC_p\Delta T \quad [\text{F2-5}]$$

$$q_1 = -KA \frac{\partial T}{\partial x} = -K \frac{A}{e} \Delta T \quad [\text{F2-6}]$$

$$q_1 \cong q_2 \quad \circ \quad q_1 \leq q_2 \quad \circ \quad q_1 \geq q_2$$

$$mC_p\Delta T \cong -K \frac{A}{e} \Delta T \quad [\text{F2-7}]$$

$$0 \cong mC_p\Delta T + K \frac{A}{e} \Delta T \quad [\text{F2-8}]$$

Factor común ΔT

$$\Delta T \left(mC_p\Delta T + K \frac{A}{e} \right) \quad [\text{F2-9}]$$

$$(55 - 35)^\circ\text{C} \left(\dot{m}_a C_p \Delta T + K \frac{A}{e} \right) \quad [\text{F2-10}]$$

Por lo tanto:

$(\dot{m}_{H_2,T} - \dot{m}_{H_2,M})(\Delta H_{combustión}) \geq or \leq (55 - 35)^\circ C \left(\dot{m}_a C_p \Delta T + K \frac{A}{e} \right)$ que es la ecuación 13 de la tesis.

F3. Cálculo de balance energético de DASSA-M y DASSA-T con datos de Valdez-Vazquez *et al.*, 2006

Para obtener el C_p de la FORSU (Ec. 13) se promediaron los C_p de algunos componentes de la misma, como se muestra en la tabla F3-1.

La alimentación de los DASS se acondiciona para tener 35% de sólidos totales. El C_p promedio representa el C_p de los sólidos totales, por lo que el valor final se ve afectado por el C_p del agua, que representa el 65% restante de la alimentación (FORSU acondicionada). El valor final a utilizar es entonces $C_p=3.009$ kJ/kg°C. La tabla F3-2 muestra todas las propiedades térmicas utilizadas en el balance.

La tabla F3-3 muestra la totalidad de las consideraciones para el escalamiento de los resultados experimentales a nivel laboratorio a un nivel planta piloto. El tiempo de residencia másico (TRM) permaneció constante, mientras que el volumen másico de operación se vio afectado por el volumen de escalamiento, que fue de 1 L a 1000 m³. Para el diseño del reactor se tomó una L/D igual a 3, por lo que el área total de transferencia superficial es de 576.6 m². Las características del aislante de fibra de vidrio propuesto fueron: un coeficiente de conductividad térmica (K) de 4.18 kJ/m²°Cd y un espesor de 0.025m.

Tabla F3-1. Capacidades caloríficas de componentes de la FORSU en peso seco (Badui, 2006)

Sustratos	C_p^a (kJ/kg°C)	%H ₂ O	C_p peso seco ^b (kJ/kg°C)
Espárragos	3.940	93.0	0.698
apio	3.980	93.7	0.946
rábano	3.270	73.4	0.748
patatas	3.430	77.8	0.788
naranja	3.770	87.2	0.950
		C_p promedio	0.826
		DE^c	0.116

Notas: ^a: Capacidad calorífica reportada en literatura, ^b: capacidad calorífica en base sólidos totales, ^c: desviación estándar

Tabla F3-2. Propiedades térmicas de los elementos involucrados en el balance térmico

Propiedades	Valor	Unidades
$C_{p_{\text{FORSU}}}$	3.009	kJ/kg°C
$C_{p_{\text{H}_2\text{O}}}$	4.184	kJ/kg°C
$\Delta H_{\text{C}_{\text{H}_2}}$	-241.6	kJ/mol

En la primera mitad de la tabla F3-4, se muestran los resultados obtenidos por Valdez-Vázquez *et al.* (2006). La parte complementaria de esta misma tabla fueron los resultados producto del balance. La energía derivada por la combustión del hidrógeno (E) en RT fue 2.18 veces superior a la calculada para RM (-42.7E6 y -19.6E6, respectivamente). La comparación energética entre RT y RM (ΔE) representa la ganancia energética obtenida bajo RT. Este valor fue de -23,135,257 KJ/d, que comparado con el producto de la Ec. 14 ($\text{Net}Q_{\text{heating}}$) resulta aproximadamente 6 veces superior. Con esto queda demostrado, que bajo las consideraciones hechas, y con los valores reportados por nuestro grupo, la termofilia resulta ser más provechosa que la mesofilia, a pesar del gasto energético que requiere (esto aplica a las condiciones de Valdez-Vazquez *et al.*, 2006).

Tabla F3-3. Consideraciones de diseño y escalamiento, Poggi-Varaldo, (2008) comunicación personal, (Perry, 1992)

Parámetro	Valor
B_m	11 g SV/kg _{bh} /d
M_r	1x10 ⁶ kg sólidos húmedos
TRM	21 d
T_{ref}	15 °C
m_a	47619 kg _{bh} /d
$V_{\text{diseño}}$	1000 m ³
Relación L/D	3
D	7.52 m
L	22.55 m
Área superficial	576.62 m ²
k	3.438 KJ/m K d
e	0.025 m
$\Delta \hat{H}_{\text{comb}}$	286 KJ/mol
C_p	4.4 KJ/Kg _{bh} K

Tabla F3-4. Balance de energía, Termofilia vs Mesofilia

	Régimen	
	T (55°C)	M (35°)
Producción (NmL H ₂ /gSV)	360	165
%H ₂ en biogás	0.80	0.37
%CO ₂ en biogás	0.20	0.63
^a m _{H₂} (gH ₂ /d)	353,571	162,053
^b E (KJ/d)	-42.7E6	-19.6E6
^c T/M		2.18
^d ΔE (KJ/d)	-23,135,357.14	

^eCalor neto transferido (KJ/d) -4,793,612.88

Notas. T: termofilia, M: mesofilia^a: masa de H₂ producido, ^b: energía derivada por la combustión del hidrógeno producido, ^c: relación de H₂ producción en termofilia y mesofilia, ^d: diferencia energética entre regímenes termofílico y mesofílico, ^e: Net Q_{heating} de la ec.14.

F4. Cálculo de balance energético de DASSA-M y DASSA-T con datos propios

Para todo el periodo de operación:

$$m_{H_2} = 1.1 \frac{mLH_2}{d} * \frac{1mmol}{22.4 mL} * \frac{2mg}{mmol} = 0.098 \frac{mgH_2}{d} \quad [F4-1]$$

$$E \left(\frac{KJ}{d} \right) = 241.6 \frac{KJ}{mol} * \frac{mol}{2g} * \frac{1g}{1000mg} * 0.098 \frac{mgH_2}{d} = 0.012 \frac{KJ}{d} \quad [F4-2]$$

$$NetQ_{heating} = \left[\left(0 \frac{mgH_2}{d} - 0.098 \frac{mgH_2}{d} \right) * \left(-286 \frac{KJ}{mol} * \frac{mol}{2gH_2} * \frac{1gH_2}{1000mgH_2} \right) \right] - 0.012 \frac{KJ}{d} = 0.002 \frac{KJ}{d} \quad [F4-3]$$

Para el periodo de mejor desempeño:

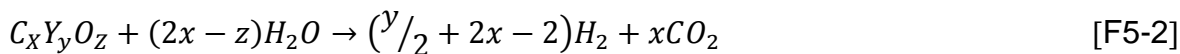
$$m_{H_2} = 8.6 \frac{mLH_2}{d} * \frac{1mmol}{22.4 mL} * \frac{2mg}{mmol} = 0.768 \frac{mgH_2}{d} \quad [F4-4]$$

$$E \left(\frac{KJ}{d} \right) = 241.6 \frac{KJ}{mol} * \frac{mol}{2g} * \frac{1g}{1000mg} * 0.768 \frac{mgH_2}{d} = 0.093 \frac{KJ}{d} \quad [F4-5]$$

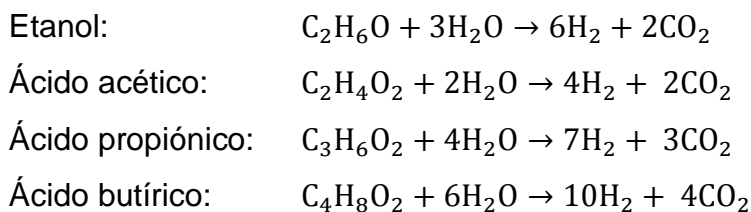
$$NetQ_{heating} = \left[\left(0 \frac{mgH_2}{d} - 0.768 \frac{mgH_2}{d} \right) * \left(-286 \frac{KJ}{mol} * \frac{mol}{2gH_2} * \frac{1gH_2}{1000mgH_2} \right) \right] - 0.093 \frac{KJ}{d} = 0.017 \frac{KJ}{d} \quad [F4-6]$$

F5. Eficiencia de conversión de sustrato

$$\eta_{H_2/sustrato} = \left[\frac{H_2 \text{ cosechado}}{\text{máximo } H_2} \right] * 100 \quad [\text{F5-1}]$$



los metabolitos encontrados fueron:



El hidrógeno producido por $R_p = 0.012 \text{ mol/L}$ y para $G_3 = 0.010 \text{ mol/L}$, en la tabla se muestra los datos de los resultados obtenidos, el máximo de hidrógeno esperado y el promedio de la conversión del sustrato.

Tabla F5-1. Promedio de eficiencia de conversión de sustrato

Especie	Máximo H_2 esperado mol/L	H ₂ cosechado		Eficiencia de conversión de sustrato	
		mol/L		η (%)	
		Rp	G3	Rp	G3
Etanol	0.27	0.012	0.010	4.34	4.08
Ácido acético	0.23	0.012	0.010	5.07	4.76
Ácido propionico	0.10	0.012	0.010	11.82	11.10
Ácido butírico	0.12	0.012	0.010	9.69	9.10
Promedio				7.73	7.26
Desviación estándar				2.55	2.40

F6. La eficiencia de conversión de luz

$$\eta_{H_2/luz} = \frac{H_{2,cosechado}(mmolH_2) * \Delta H_{C,H_2} \left(\frac{J}{mmol} \right)}{I \left(\frac{W}{m^2} \right) * A(m^2) * t(s)} * 100 \quad [F6-1]$$

$$\Delta H_{C,H_2} = 286 \frac{J}{mmol}$$

$$I = 17.90 \text{ W}/m^2$$

$$A = 0.045 \text{ m}^2$$

$$V_{op} = 2L$$

t	Rp					G3				
	mmolH ₂ /L	mmolH ₂	□(P _{H2} , no cum)	P _{H2cu} m	□(P _{H2} cum)	mmolH ₂ /L	mmolH ₂	□(P _{H2} no cum)	P _{H2cu} m	□(P _{H2} cum)
0	0.00	0.00		0.00		0.00	0.00		0.00	
3	5.90	11.79	1.61	11.79	1.61	6.06	12.12	1.66	12.12	1.66
6	3.62	7.23	0.50	19.02	1.30	3.19	6.38	0.44	18.50	1.27
9	0.77	1.54	0.07	20.56	0.94	1.04	2.07	0.09	20.57	0.94
1										
2	0.51	1.02	0.03	21.58	0.74	0.32	0.63	0.02	21.20	0.73
1										
5	1.01	2.01	0.06	23.59	0.65	0.48	0.95	0.03	22.15	0.61

Para calcular el área irradiada (A), se hace de la siguiente manera:

Se calcula la superficie de una esfera, ya que la luz irradiada por la lámpara de tungsteno forma una esfera, y solo una parte de esa luz es la que es absorbida en la cara del reactor (Figura F6.1). Se calcula la superficie de la esfera con la Ec. F6.1:

$$S = 4\pi r^2 \quad [F6-2]$$

donde:

S = área de la esfera formada por la luz irradiada (m²)

r = radio de la esfera (m) = 0.2 m, en nuestro trabajo, es la distancia entre el foco y la pared del fotobiorreactor

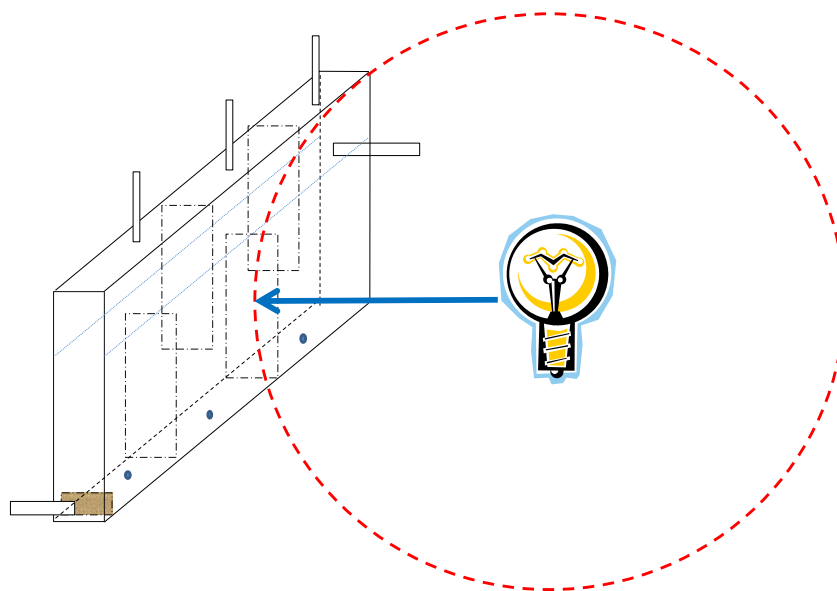


Figura F6.1. Esquema de la esfera formada por la luz irradiada

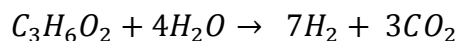
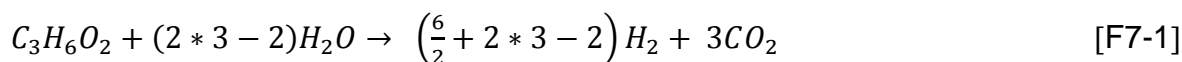
Se tiene un valor de $s = 0.503 \text{ m}^2$, con este valor se calcula la I , se obtiene un valor de 17.90 W/m^2 . Se conoce (<http://www.rapidtables.com/calc/light/lux-to-watt-calculator.htm>) que 3000 lx empleando lámpara de tungsteno, equivale a 9 W .

El área irradiada es el área de la cara del reactor, la cara es un rectángulo de $0.3 \times 0.15 \text{ m}$, por lo tanto el $A = 0.045 \text{ m}^2$.

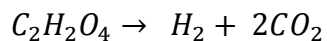
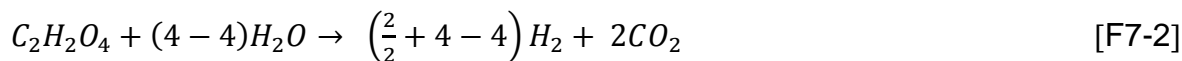
F7. Moles teóricos de hidrógeno producido en fotofermentación (Koku *et al.*, 2002)

Se tiene la ecuación general $C_xH_yO_z + (2x - z)H_2O \rightarrow (y/2 + 2x - z)H_2 + xCO_2$ con la que se calcula el número de moles de hidrógeno producidos con diferentes tipos de sustrato orgánico, usando como ejemplo el:

Ácido láctico ($C_3H_6O_2$): $x = 3, y = 6, z = 2$



Ácido oxálico ($C_2H_2O_4$): $x = 2, y = 2, z = 4$



F8. Balance de energía para FASSH-VI

A continuación se muestra el esquema (F8.1) de la FASSH-VI, se representa el estado inicial para el cual se supone una temperatura ambiente (T_{amb}) de 5°C. La temperatura en que se opero (T_r) fue de 35°C. El tiempo de incubación fue de 1972 h.

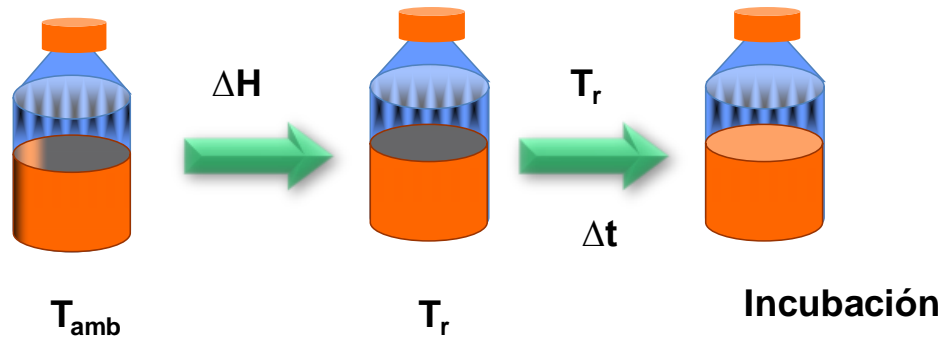


Figura F8.1. Esquema de incubación y calentamiento de la FASSH-VI.

Se calculó la energía requerida con la siguiente ecuación:

$$E_{requerida} \cong \Delta H_{\substack{\text{FORSA} \\ T_{amb} \rightarrow T_r}} + \Delta H_{\substack{\text{reactor} \\ T_{amb} \rightarrow T_r}} + Q_{\substack{\text{calefacción} \\ \text{para mantener} \\ \text{a } T_r}} + E_{mezclado} \quad [\text{F8-1}]$$

Se calculo $\Delta H_{\substack{\text{FORSA} \\ T_{amb} \rightarrow T_r}}$ de la siguiente manera:

$$\Delta H_{\substack{\text{FORSA} \\ T_{amb} \rightarrow T_r}} = m_{FORSA} * C_{pFORSA}(T_r - T_{amb}) \quad [\text{F8-2}]$$

Se calculó $\Delta H_{\text{calentamiento}}$:

$$\Delta H_{\text{calentamiento}} = m_{\text{reactor}} * C_{p_{\text{reactor}}}(T_r - T_{\text{amb}}) + m_{\text{aislante}} * C_{p_{\text{aislante}}}(T_r - T_{\text{amb}}) \quad [\text{F8-3}]$$

La energía de mezclado (E_{mezclado}), se calculó de la siguiente manera:

$$E_{\text{mezclado}} = \hat{P} \left(\frac{W}{m_r^3} \right) * V_r(m^3) * \Delta t(s) \quad [\text{F8-4}]$$

Por último, se calculó $Q_{\text{calefacción para mantener a } T_r}$ con la siguiente fórmula:

$$Q_{\text{calefacción para mantener a } T_r} = U A_r (T_r - T_{\text{amb}}) \quad [\text{F8-5}]$$

Todo esto se realiza para evaluar si la energía requerida para llevar a cabo la FASSH-VI, es mayor, igual o menor a la energía que aporta el hidrógeno producido en la misma ($\dot{E}_{\text{requerida}} \geq E_{H_2}$). Por lo tanto, la energía requerida es la suma de todas las energías involucradas, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$E_{\text{requerida}} = (m_{\text{FORSA}} * C_{p_{\text{FORSA}}} + m_{\text{reactor}} * C_{p_{\text{reactor}}} + m_{\text{aislante}} * C_{p_{\text{aislante}}} + U A_r * T_r - T_{\text{amb}} + P * V_r * \Delta t_{\text{neto}}) \quad [\text{F8-6}]$$

Posteriormente, se calculó la energía aportada por el hidrógeno producido en la FASSH-VI.

$$E_{H_2} = P_{H_2} \left(\frac{\text{mmol}}{g_{ss}} \right) * m_{\text{FORSA}} (g_{ss}) * \left(\frac{ST(\%)}{100} \right) * \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mmol}} * \Delta H_{C,H_2} \left(\frac{J}{\text{mol}} \right) \quad [\text{F8-7}]$$

Cálculos para la FORSA.

$$m_{FORSA} = 1 \times 10^6 \text{ kg}_{bh}$$

$$Cp_{FORSA} = 3.009 \text{ KJ/Kg}^\circ\text{C}$$

$$T_r = 35^\circ\text{C}$$

$$T_{amb} = 5^\circ\text{C}$$

$$\begin{aligned} \Delta H_{\text{calentamiento}} &= (1 \times 10^6 \text{ kg}_{bh})(3.009 \text{ KJ/Kg}^\circ\text{C})(35^\circ\text{C} - 5^\circ\text{C}) = 90270000 \text{ KJ} \\ &= 90.27 \times 10^6 \text{ KJ} = 9.03 \times 10^7 \text{ KJ} = 9.03 \times 10^{10} \text{ J} \end{aligned}$$

Cálculos para el reactor, se usaran los datos de fibra de vidrio como aislante. Se supuso acero como material del reactor.

Para el aislante del reactor:

$$\rho_{\text{aislante}} = 2.58 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} = 2580 \frac{\text{Kg}}{\text{m}^3}$$

$$A = 576.62 \text{ m}^2$$

$$e = 0.0381 \text{ m}$$

$$m_{\text{aislante}} = \rho_{\text{aislante}} * A * e = 2580 \frac{\text{Kg}}{\text{m}^3} * 576.62 \text{ m}^2 * 0.0381 \text{ m} = 56527.8 \text{ Kg}$$

$$Cp_{\text{aislante}} = 0.19 \frac{\text{Kcal}}{\text{Kg}^\circ\text{C}} = 0.7942 \frac{\text{KJ}}{\text{Kg}^\circ\text{C}}$$

$$T_r = 35^\circ\text{C}$$

$$T_{amb} = 5^\circ\text{C}$$

$$\begin{aligned} \Delta H_{\text{calentamiento}} &= (56527.8 \text{ Kg}) \left(0.7942 \frac{\text{KJ}}{\text{Kg}^\circ\text{C}} \right) (35^\circ\text{C} - 5^\circ\text{C}) = 1346831.36 \text{ KJ} \\ &= 1.35 \times 10^9 \text{ J} \end{aligned}$$

Para el metal del reactor:

$$\rho_{metal} = 7860 \frac{Kg}{m^3}$$

$$A = 576.62 m^2$$

$$e = 0.01 m$$

$$m_{metal} = \rho_{metal} * A * e = 7860 \frac{Kg}{m^3} * 576.62 m^2 * 0.01 m = 45322.33 Kg$$

$$Cp_{metal} = 0.12 \frac{Kcal}{Kg^{\circ}C} * \frac{4.19 KJ}{1Kcal} = 0.5028 \frac{KJ}{Kg^{\circ}C}$$

$$T_r = 35^{\circ}C$$

$$T_{amb} = 5^{\circ}C$$

$$\Delta H_{calentamiento}_{metal} = (45322.33Kg) \left(0.5028 \frac{KJ}{Kg^{\circ}C} \right) (35^{\circ}C - 5^{\circ}C) = 6.84 * 10^8 J$$

$$\Delta H_{calentamiento}_{reactor} = \Delta H_{calentamiento}_{aislante} + \Delta H_{calentamiento}_{metal} = 1.35 * 10^9 J + 6.84 * 10^8 J = 2.034 * 10^9 J$$

Para $Q_{calefacción}$ para mantener a T_r , se calculó U :

$$U_{total} = \frac{k_{aislante}}{e_{aislante}} = 0.80 \left(\frac{k}{e} \right) \quad [F8-8]$$

$$e_{aislante} = 1.5 in = 0.0381 m$$

$$k_{aislante} = 0.03477 \frac{W}{mk}$$

$$U = \frac{0.03477 \frac{W}{mk}}{0.38m} * 0.80 = 0.73 \frac{W}{m^2k}$$

$$A = 576.62 m^2$$

$$T_r = 35^{\circ}C$$

$$T_{amb} = 5^{\circ}\text{C}$$

$$Q_{\substack{\text{calefacción} \\ \text{para mantener} \\ \text{a } T_r}} = 0.73 \frac{\text{W}}{\text{m}^2\text{k}} * 576.62 \text{ m}^2 * (35^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C})$$

$$= 12663.7 \text{ W} * 60\text{d} * 24\text{h} * 3600\text{s} = 6.56 * 10^{10} \text{ J}$$

La potencia especifica es:

$$\hat{P} = \frac{P}{V_{\text{FORSA en el reactor}}} * \text{factor de mezclado intermitente} \quad [\text{F8-9}]$$

Para obtener el dato de \hat{P} , primero se calcula el $N_{Re} = \frac{D_a^2 n \rho}{\mu}$ (F8-10), donde D_a^2 = diámetro de la turbina, n = rps; ρ = densidad de la FORSA; en este caso se considero el del puré de papa (Panagiotis *et al.*, 2009); μ = viscosidad dinámica de la FORSA, en este caso se considero la del puré de papa (Panagiotis *et al.*, 2009).

$$D_a^2 = (1.83 \text{ m})^2$$

$$n = 6 \frac{\text{r}}{\text{m}} * \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}} = 0.1 \frac{\text{r}}{\text{s}}$$

$$\rho = 1079 \frac{\text{Kg}}{\text{m}^3}$$

$$\mu = 28 \frac{\text{Kg}}{\text{m} \cdot \text{s}}$$

$$N_{Re} = \frac{(1.83 \text{ m})^2 * 0.1 \frac{\text{r}}{\text{s}} * 1079 \frac{\text{Kg}}{\text{m}^3}}{28 \frac{\text{Kg}}{\text{m} \cdot \text{s}}} = 7.05$$

Con este valor de N_{Re} se busca en tablas el $N_p = 5.0$ (Perry, 1992). Posteriormente, se calculó la P, se la siguiente manera:

$$P = \frac{N_p n^3 D_a^5 \rho}{g_c} = \frac{5.0 * (0.9 \frac{\text{r}}{\text{s}})^3 * (1.83 \text{ m})^5 * 1079 \frac{\text{Kg}}{\text{m}^3}}{9.81 \frac{\text{m}}{\text{s}^2}} = 8228.21 \frac{\text{Kg} \cdot \text{m}}{\text{s}} \quad [\text{F8-11}]$$

Se tiene la equivalencia siguiente: $1 \frac{\text{Kg} \cdot \text{m}}{\text{s}} = 9.81 \text{ W} = 9810 \text{ KW}$, por lo tanto:

$$P = 80718749.65 \text{ KW}$$

Se va agitar una masa húmeda de FORSA de 1×10^6 Kg, el volumen ocupado por dicha masa es de 926.78 m^3 . Por otro lado, el mezclado será intermitente, se considero mezclar 15 min cada 4 horas.

$$\text{mezclado intermitente} = \frac{15 \text{ min}}{4 \text{ h}} = 1.5 \frac{h_{\text{mezclado}}}{d}$$

$$86 \frac{\text{KW}}{\text{m}^3} * \left(\frac{10}{54}\right)^3 = 86 * 6.2 * 10^{-3} \frac{\text{KW}}{\text{m}^3} = 545 \frac{\text{W}}{\text{m}^3}$$

$$\Delta t = 60d, \text{ en cada día } \Delta t' = 0.45 \frac{h}{d}$$

$$\begin{aligned} E_{\text{mezclado}} &= \hat{P} * V * 60d * 2 \frac{h}{d} * 3600 \frac{h}{s} = 545 \frac{\text{W}}{\text{m}^3} * 927\text{m}^3 * 120 * 3600 \\ &= 2.18 * 10^{11} \text{ J} \end{aligned}$$

Por lo tanto, la energía requerida fue la siguiente:

$$E_{\text{mezclado}} = 2.18 * 10^{11} \text{ J}$$

$$\Delta H_{\text{calentamiento}}^{\text{FORSA}} = 9.03 * 10^{10} \text{ J}$$

$T_{\text{amb}} \rightarrow T_r$

$$Q_{\text{calefacción}}^{\text{para mantener a } T_r} = 6.56 * 10^{10} \text{ J}$$

$$\Delta H_{\text{calentamiento}}^{\text{reactor}} = 2.034 * 10^8 \text{ J}$$

$T_{\text{amb}} \rightarrow T_r$

$$E_{\text{requerida}} = 1.86 * 10^{11} \text{ J}$$

La energía aportada por el hidrógeno producido se calculó de la siguiente manera:

$$E_{H_2} = P_{H_2} \left(\frac{\text{mmol}}{g_{SS}} \right) * m_{\text{FORSA}} (g_{bh}) * \left(\frac{ST\%}{100} \right) * \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mmol}} * \Delta H_{c,H_2} \left(\frac{\text{KJ}}{\text{mol}} \right) \quad [\text{F8-}$$

12]

$$E_{H_2} = 3030 \frac{\text{mmol}}{kg_{SS}} * 1 \times 10^6 kg_{bh} * \left(\frac{18}{100} \right) * \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mmol}} * 241.6 \left(\frac{\text{KJ}}{\text{mol}} \right) = 131768640 \text{ KJ}$$

Así que:

$$E_{\text{requerida}} = 4.64 \times 10^{13} \text{ KJ}$$

$$E_{H_2} = 1.32 \times 10^8 \text{ KJ}$$

Por lo tanto para la FASSH-VI:

$$E_{requerida} > E_{H_2}$$

F9. Balance de energía para DASSA-M

Se realizó un balance para la DASSA-M, considerando la energía de calentamiento y la energía de mezclado

$$\Delta H_{\text{calentamiento}} = (1 \times 10^6 \text{ kg}_{bh}) (3.009 \text{ KJ}/\square \text{g}^\circ\text{C}) (35^\circ\text{C} - 25^\circ\text{C}) = 30090000 \text{ KJ}$$

DASSA-M
T_{amb}→T_r

$$E_{\text{mezclado}} = \hat{P} * V_r = \frac{80718749.65 \text{ KW}}{926.78 \text{ m}^3} * 0.075 * 926.78 \text{ m}^3 = 6053906.22 \text{ KW}$$

Los DASSA-M se operaron 150 días, por lo tanto la

$$E_{\text{mezclado}} = 1681.64 \frac{\text{KW}}{\text{h}} = 6053906.22 \text{ KJ}$$

Se realizó un balance de energía obtenida por el hidrógeno producido en DASSA-M

$$E_{H_2} = \dot{m}_{H_2} (g) * \Delta H_{c,H_2} \left(\frac{\text{KJ}}{\text{g}} \right) = 116.65 \text{ g} * 122 \frac{\text{KJ}}{\text{g}} = 14230.72 \text{ KJ}$$

As que: ´

$$E_{\text{requerida}} = 36143906.22 \text{ KJ}$$

$$E_{H_2} = 14230.72 \text{ KJ}$$

Por lo tanto para la DASSA-M:

$$\mathbf{E_{requerida} \gg E_{H_2}}$$