



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

**PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO A PARTIR DE LOS RESIDUOS  
SÓLIDOS ORGÁNICOS DE UNA CAFETERÍA**

TESIS  
que para optar por el grado de:  
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:  
**MARTHA CRISTINA BUJANOS ADAME**

TUTOR PRINCIPAL  
**Dr. Iván Moreno Andrade**  
Instituto de Ingeniería

COMITÉ TUTOR  
Dr. Simón González Martínez, Instituto de Ingeniería  
M.I. Constantino Gutiérrez Palacios, Facultad de Ingeniería

MÉXICO, D.F., **SEPTIEMBRE** 2013

JURADO ASIGNADO:

Presidente:	Dr. Simón González Martínez
Secretario:	Dr. Germán Buitrón Méndez
Vocal:	Dr. Iván Moreno Andrade
1 <sup>er</sup> suplente:	M.I. Constantino Gutiérrez Palacios
2 <sup>do</sup> suplente:	Dra. Georgina Fernández Villagómez

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Investigaciones en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA) de la Unidad Académica de Juriquilla del Instituto de Ingeniería, UNAM

TUTOR DE TESIS:

**Dr. Iván Moreno Andrade**

---

FIRMA

# APOYOS RECIBIDOS

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



**INSTITUTO  
DE INGENIERÍA  
UNAM**

**LIPATA**

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN  
EN PROCESOS AVANZADOS DE  
TRATAMIENTO DE AGUAS

Se agradece el apoyo financiero del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General Asuntos del Personal Académico-UNAM a través del proyecto RR180612.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría (No. de becario 512015879).

# *Agradecimientos*

Al posgrado de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM por el apoyo brindado para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Iván Moreno Andrade por la asistencia, orientación y consejos que hicieron posible este trabajo.

Al Dr. Simón González Martínez por su participación, apoyo, enérgicos consejos y sugerencias aportadas a este trabajo. Gracias por su disposición y tiempo, le estaré siempre agradecida.

Al Dr. Germán Buitrón Méndez por su ejemplo dentro y fuera del aula y laboratorio, para mí es ejemplo incansable de constancia, trabajo y dedicación. Gracias por los comentarios y edición de este trabajo.

Al M.I. Constantino Gutiérrez Palacios por sus valiosas aportaciones.

A la Dr. Georgina Fernández Villagómez por su tiempo en la revisión y valiosas aportaciones.

A la M.C. Gloria Moreno Rodríguez a quien tampoco puedo dejar de dedicarle este trabajo y estarle eternamente agradecida por los consejos, apoyo técnico en el trabajo de investigación pero sobre todo, por la amistad que siempre me brindó. Aquellos que tenemos la fortuna de formar parte del grupo de trabajo del Laboratorio de Investigaciones en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA) de la Unidad Académica de Juriquilla del Instituto de Ingeniería, UNAM, sabemos que su presencia y comentarios son indispensables y valiosos para nuestra formación. Gracias Maestra Gloria.

Al M.C. Jaime Pérez Trevilla por su disposición, enseñanzas y asistencia en el trabajo de investigación. Estás y estarás en todos los agradecimientos de quienes tenemos la suerte de contar con tu amistad y apoyo en el laboratorio. Muchas gracias Jaime.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de esta tesis.

A mis amigos del grupo de maestría: René Cardeña Dávila por sus valiosas sugerencias y aportaciones en la elaboración de la parte de resultados de este trabajo. Gerardo Muñoz Montoya por sus inconfundibles relatos y comentarios acerca de lo que acontecía a nuestro alrededor, siempre había carcajadas en torno a ello. Andrés Martínez Arce por su tiempo, paciencia y comentarios. Sonia Santiago Cruz por su ejemplo de tenacidad y trabajo. Julián Oviedo Santana por su paciencia y muestras de afecto durante el periodo de maestría. Por todos aquellos "*Precious moments*".

# *Dedicatoria*

A Rafael Bujanos, por ser el padre más bondadoso, amable y tierno. No hay día que no agradezca tenerte en mi vida y todo el apoyo y consejos que me has brindado han servido para realizar mis sueños. Cuando he tenido duda del camino a seguir siempre me orientas y permites que cometa mis propios errores esperando a que aprenda. Gracias papá, eres el mejor regalo de mi vida

A Marcela Adame, madre... gracias por toda la ayuda y consejos brindados a lo largo de mi vida y especialmente en estos últimos años donde me ha tocado decidir las cosas más difíciles. Empezar esta aventura que hoy culmina con este trabajo fue producto de tu aliento y ánimo. Te quiero mucho

A Alejandro y Ferdinando Bujanos, por ser unos maravillosos hermanos. Les agradezco la compañía y el ejemplo de perseverancia que siempre me dan

A Chapis y Canela, que alegran cada día de nuestras vidas

*A Ustedes va dedicado este trabajo de tesis*

# CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>III</b>
<b>ÍNDICE de TABLAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE de FIGURAS</b> .....	<b>V</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>VI</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>VII</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>IX</b>
<b>I. CONCEPTOS BÁSICOS</b> .....	<b>1</b>
1.1 Residuos sólidos orgánicos (RSO).....	1
1.2 Componentes principales de los RSO y su fermentación .....	2
1.2.1 Carbohidratos.....	2
1.2.2 Lípidos .....	2
1.2.3 Proteínas .....	3
1.3 Hidrógeno (H <sub>2</sub> ).....	3
1.4 Proceso anaerobio .....	5
1.5 Producción de H <sub>2</sub> por medio de la fermentación oscura.....	7
1.6 Microorganismos productores de H <sub>2</sub> .....	9
1.7 Modelo de Gompertz. Cinética del proceso de producción de hidrógeno .....	11
1.8 Principales microorganismos consumidores de H <sub>2</sub> .....	12
1.8.1 Bacterias sulfato reductoras (BSR).....	12
1.8.2 <i>Archeas</i> productoras de metano (APM) .....	13
1.8.3 Bacterias ácido lácticas (BAL) .....	13
1.8.4 Bacterias homoacetogénicas (BHA).....	14
1.9 Inhibidores químicos de la metanogénesis y sus aplicaciones.....	14
1.9.1 Categoría y características de los inhibidores de la metanogénesis .....	15
1.10 Producción de H <sub>2</sub> por medio de cultivos mixtos.....	19
1.10.1 Inhibición ácida y cambios de pH .....	19
1.10.2 Control por medio de la tasa de dilución y TRH.....	20
1.10.3 Tratamiento térmico .....	21
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	<b>23</b>
2.1 Factores que afectan la producción biológica de H <sub>2</sub> a partir de los residuos sólidos orgánicos .....	23
2.1.1 pH .....	23

2.1.2	Temperatura.....	24
2.1.3	Tamaño de la partícula .....	25
2.1.4	Concentración de sólidos iniciales .....	25
2.1.5	Presión parcial de hidrógeno (PpH <sub>2</sub> ).....	26
2.1.6	Concentración de Ácidos Grasos Volátiles (AGVs) .....	27
2.2	Reactor anaerobio discontinuo por lotes (SBR).....	28
<b>III.</b>	<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>31</b>
3.1	Plan experimental.....	31
3.2	Etapa I. Caracterización de los RSO.....	32
3.3	Etapa II. Pretratamientos del inóculo .....	32
3.4	Etapa III. Diseño, arranque y operación de un biorreactor .....	33
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS y DISCUSIÓN .....</b>	<b>37</b>
4.1	Etapa I. Caracterización de los RSO.....	37
4.2	Etapa II. Pretratamientos del inóculo .....	39
4.2.1	Pretratamiento con Cloroformo (CHCl <sub>3</sub> ).....	39
4.2.2	Pretratamiento con Lumazina .....	41
4.2.3	Pretratamiento térmico .....	43
4.3	Etapa III. Arranque y operación de un biorreactor .....	45
4.3.1	Efecto del TRH en la composición del biogás.....	45
4.3.2	Efecto del TRH en la producción de hidrógeno (cinéticas).....	47
4.3.3	Productos intermediarios de la fermentación .....	48
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>50</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>51</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>52</b>

## ABREVIATURAS

AGVs	Ácidos grasos volátiles
APM	<i>Archeas</i> productoras de metano
atm	Atmósferas
ATP	Adenosin trifosfato
BAL	Bacterias ácido lácticas
BHA	Bacterias homoacetogénicas
BSR	Bacterias sulfato reductoras
CH <sub>4</sub>	Metano
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CoM	Coenzima M
d	Días
DQO	Demanda química de oxígeno
g	Gramos
h	Horas
H <sub>2</sub>	Hidrógeno
kg	Kilogramo
kJ	Kilo Joule
L	Litro
M	Molaridad
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
N	Normalidad
Pa	Pascal
PEH	Producción específica de hidrógeno
PH	Producción de hidrógeno
PpH <sub>2</sub>	Presión parcial de hidrógeno
rem	Removidos
rpm	Revoluciones por minuto
RSO	Residuos sólidos orgánicos
RSU	Residuos sólidos urbanos
SBR	Sequencing batch reactor
SF	Sólidos fijos
ST	Sólidos totales
SV	Sólidos volátiles
TCO	Tasa de carga orgánica
TRH	Tiempo de retención hidráulica
TRS	Tiempo de retención de sólidos
λ	Fase de latencia
μL	Microlitros



## ÍNDICE de TABLAS

<b>Tabla 1.1</b> Comparación de la energía por unidad de masa y emisión específica de carbono e hidrógeno comparado con otros combustibles.....	4
<b>Tabla 1.2</b> Ventajas y desventajas del hidrógeno, H <sub>2</sub> (Edwards <i>et al.</i> , 2008).....	5
<b>Tabla 1.3</b> Importantes procesos bioquímicos en consorcios anaerobios y metanogénicos (adaptado de Madigan <i>et al.</i> , 2009) .....	10
<b>Tabla 1.4</b> Aplicaciones de inhibidores químicos metanogénicos.....	17
<b>Tabla 1.5</b> Tratamientos térmicos aplicados a diversos inóculos.....	22
<b>Tabla 2.1</b> Estimación de los rendimientos de producción de H <sub>2</sub> en reactores anaerobios sobre el tratamiento de residuos de alimento como sustrato .....	24
<b>Tabla 2.2</b> Descripción operacional del SBR.....	30
<b>Tabla 3.1</b> Pretratamientos del inóculo evaluados .....	33
<b>Tabla 3.2</b> Medio mineral definido .....	36
<b>Tabla 4.1</b> Selección y cuantificación de subproductos de los residuos sólidos orgánicos.....	38
<b>Tabla 4.2</b> Caracterización de los residuos sólidos orgánicos empleados en este estudio.....	38
<b>Tabla 4.3</b> Producción de biogás, efecto del pretratamiento con cloroformo sobre el inóculo .....	40
<b>Tabla 4.4</b> Producción de biogás, efecto del pretratamiento con lumazina sobre el inóculo .....	42
<b>Tabla 4.5</b> Producción de AGVs en las pruebas del pretratamiento al inóculo .....	44
<b>Tabla 4.6</b> Condiciones de operación y principales parámetros medidos.....	45
<b>Tabla 4.7</b> Producción de AGVs para los distintos TRH evaluados.....	48

# ÍNDICE de FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Esquema de reacción propuesto para la digestión anaerobia. Adaptado de Kaspar y Wuhrmann (1978).....	7
<b>Figura 1.2</b> Estructura de la CoM de los metanógenos y sus análogos estructurales .....	16
<b>Figura 1.3</b> Descripción de las vías de inhibición de varios compuestos químicos utilizados frecuentemente y la cadena anaerobia para la conversión de materia orgánica a metano: $\text{CHCl}_3$ (cloroformo), BES (2-bromoetilsulfonato), $\text{FCH}_2\text{COONa}$ (fluoroacetato), $\text{FCH}_3$ (fluoruro de metilo), Lmz (Lumazina), (Liu <i>et al.</i> , 2011) .....	18
<b>Figura 1.4</b> La transición de las esporas inactivas a las formas vegetativas activas. Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo (2009).....	22
<b>Figura 2.1</b> Fases típicas de operación de un SBR .....	28
<b>Figura 3.1</b> Estrategia experimental seguida.....	31
<b>Figura 3.3</b> (A). Fotografía de la estrategia experimental: (1) baño a temperatura constante, (2) bomba peristáltica de alimentación y vaciado, (3) reactor SBR de 1.25 L, (4) parrilla de agitación magnética, (5) probeta invertida para la cuantificación de biogás y (6) puerto de medición de biogás. (B). Diagrama del reactor SBR empleado en la producción biológica de $\text{H}_2$ a partir de los RSO de una cafetería .....	34
<b>Figura 4.2</b> Residuos de alimento provenientes de la cafetería de la UNAM campus Juriquilla.....	39
<b>Figura 4.3</b> Residuos homogenizados almacenados en bolsas de plástico .....	39
<b>Figura 4.4</b> Producción de $\text{H}_2$ ( $\text{mmol h}^{-1}$ ) resultado del pretratamiento con cloroformo.....	41
<b>Figura 4.5</b> Producción de $\text{H}_2$ ( $\text{mmol h}^{-1}$ ) resultado del pretratamiento con lumazina.....	42
<b>Figura 4.6</b> Efecto del pretratamiento térmico sobre el inóculo para la producción de biogás .....	44
<b>Figura 4.7</b> Comparación de la producción de $\text{H}_2$ para los diferentes TRH evaluados .....	46
<b>Figura 4.8</b> Ejemplo de las cinéticas de producción de $\text{H}_2$ a partir de los RSO. TRH de 72 h (ciclo 1), 24 h (ciclo 9), 12 h (ciclo 45) y 6 h (ciclo 59) .....	47
<b>Figura 4.9</b> Producción de AGVs en los diferentes TRH evaluados .....	49

## RESUMEN

Los residuos orgánicos son considerados una fuente importante de biomasa, incluyen restos de comida y residuos de la preparación de alimentos de residencias, establecimientos comerciales, fuentes industriales y de jardinería. La conversión de los residuos sólidos orgánicos en biogás se está convirtiendo en una práctica económicamente viable y ha demostrado ser un excelente sustrato para producir hidrógeno aplicando procesos biológicos. Por esta razón se realizó un estudio para determinar la influencia del parámetro tiempo de retención hidráulica en cuatro diferentes tiempos, 72, 24, 12 y 6 horas, para la producción de hidrógeno a partir de los residuos sólidos orgánicos obtenidos de la cafetería de la UNAM, campus Juriquilla, en un biorreactor discontinuo por lotes (SBR). Adicionalmente fueron evaluados tres distintos pretratamientos sobre un inóculo obtenido de un reactor anaerobio que degrada aguas residuales de la industria cervecera, a fin de eliminar a las archeas productoras de metano y conservar a las bacterias productoras de hidrógeno. Los tratamientos evaluados fueron, exposición del inóculo a una temperatura de 103 – 105 °C, 1 hora; y evaluación del efecto de dos inhibidores químicos de la metanogénesis tales como el cloroformo y la lumazina. Para todas las pruebas evaluadas - tanto para la caracterización de los residuos como las pruebas de inhibición química de metano sobre el inóculo - se determinó la demanda química de oxígeno (DQO total), concentración de sólidos totales, fijos y volátiles (ST, SF y SV), pH, humedad y alcalinidad con el fin de conocer las condiciones iniciales y dar inicio al arranque y operación del biorreactor. Éste se operó durante 62 ciclos de los cuales, el tiempo de retención hidráulica (TRH) inicial se estableció en 72 h (ciclos evaluados del 1 al 9), una vez que se estabilizó el proceso se procedió a disminuir el TRH a 24 h (ciclos 10-20), después a 12 h (ciclos 21-43) y finalmente a 6 h (ciclos 44-59). Se encontraron diferencias importantes en los TRHs evaluados concluyendo que la condición donde se encontró una mayor producción volumétrica y específica de hidrógeno fue a las 24 h.

# INTRODUCCIÓN

Una definición formal de residuo es aquella que lo considera un *material o producto cuyo propietario o poseedor desecha y que se encuentra en estado sólido o semisólido, o es un líquido o gas contenido en recipientes o depósitos, y que puede ser susceptible de ser valorizado o requiere sujetarse a tratamiento o disposición final*, descripción otorgada por la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR, 2003). La generación de residuos sólidos urbanos en el país se estiman en 94,800 toneladas diarias equivalentes a 34.6 millones de toneladas anuales, con una composición aproximada de un 53% de residuos orgánicos, 28% potencialmente reciclables y 19% residuos no aprovechables (SEMARNAT, 2009). Se estima que se recolecta el 87% de los residuos generados de los cuales el 64% se envía a rellenos sanitarios, sitios controlados y depósitos o tiraderos a cielo abierto y sin control (SEMARNAT, 2009).

Por otro lado, los residuos sólidos urbanos (RSU) son aquellos *generados en las casas habitación, que resultan de la eliminación de los materiales que utilizan en sus actividades domésticas, de los productos que consumen y de sus envases, embalajes y empaques; los residuos que provienen de cualquier otra actividad dentro de establecimientos o en la vía pública que genere residuos con características domiciliarias y los resultantes de la limpieza de las vías y lugares públicos* (LGPGIR, 2003). Los residuos sólidos orgánicos (RSO) están constituidos por residuos domésticos y de cocina, residuos de frutas y verduras, así como también restos de poda de jardinería y posiblemente una mínima fracción de papel; lo cual representa una fuente de composición heterogénea, razón por la cual puede considerarse como sustrato en el proceso de generación del biogás y/o bioenergía.

Este sustrato puede ser empleado para la producción de biogás y, específicamente hidrógeno, por medio de una fermentación oscura en un reactor biológico productor de biogás (Hartman, 2002). Como parte importante de ese biogás, el hidrógeno (H<sub>2</sub>) se proyecta como candidato prometedor para sustituir a los combustibles fósiles en un futuro debido a que es un gas limpio y posee un alto rendimiento energético, entre muchas otras

ventajas. La producción de hidrógeno a partir de biomasa renovable, podría jugar un papel importante en la generación de bioenergía (Brosseau *et al.*, 1986).

A fin de obtener un proceso eficiente para la producción de hidrógeno son necesarios varios elementos; el primero de ellos es un inóculo biológico que contribuye de manera significativa en la actividad biológica del sistema productor de biogás ya que posee una extensa gama de microorganismos capaces de metabolizar y convertir los sustratos añadidos en H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, y otros importantes subproductos. El segundo elemento necesario para este proceso es el sustrato (RSO) para ser convertido por los microorganismos presentes en el lodo anaerobio en biogás. El tercer elemento es el reactor productor de H<sub>2</sub> que realice la conversión de los residuos de alimento en biogás y opere bajo parámetros bien definidos como temperatura, pH, concentración de sólidos presentes en lodo y en el sustrato, velocidad de mezclado, etc. Sin embargo, el tiempo de residencia hidráulica (TRH) no ha sido bien definido, ya que varios autores recomiendan este tiempo entre valores desde 12 a 240 h (Shin *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005a; Li *et al.*, 2006; Venkata Mohan *et al.*, 2007; Valdez-Vazquez *et al.*, 2005; Han y Shin, 2004a y b).

En este trabajo se evaluaron cuatro distintos tiempos de retención hidráulica (72, 23, 12 y 6 h) en un reactor productor de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos de la cafetería universitaria de la UNAM, campus Juriquilla, con el fin de determinar bajo que TRH se obtiene la mayor generación de hidrógeno a partir del sustrato alimentado.

# OBJETIVOS

## Objetivo general

Determinar la influencia de distintos tiempos de retención hidráulica sobre la producción biológica de hidrógeno a partir de los residuos sólidos orgánicos obtenidos de la cafetería de la UNAM, campus Juriquilla.

## Objetivos particulares

- Evaluar distintos pretratamientos para el inóculo, determinando el mejor de ellos para la producción de hidrógeno.
- Caracterizar los residuos sólidos orgánicos de una cafetería de acuerdo a la NMX-AA-015-1985.
- Evaluar los parámetros fisicoquímicos y composición de biogás en el arranque y operación de un biorreactor para la producción de hidrógeno a partir de los residuos sólidos orgánicos de una cafetería.

## ALCANCES

- Se utilizarán los residuos de alimento de la cafetería de la UNAM, campus Juriquilla.
- La operación general del reactor se mantendrá en temperatura mesofílica a 35°C.
- Se conocerá el tiempo de retención hidráulica bajo la cual el reactor genera el mayor porcentaje y producción volumétrica de hidrógeno.

# I. CONCEPTOS BÁSICOS

## 1.1 Residuos sólidos orgánicos (RSO)

Los RSO incluyen restos de comida y residuos de la preparación de alimentos de las residencias, establecimientos comerciales tales como restaurantes, fuentes institucionales (comedores escolares), fuentes industriales y de jardinería (Zhu *et al.*, 2011). La conversión de los residuos de alimentos en biogás se está convirtiendo en una práctica económicamente viable y ha demostrado ser un excelente sustrato para producir hidrógeno aplicando procesos biológicos (Zhu *et al.*, 2011; Ueno *et al.*, 2007; Han y Shin, 2004).

Se ha estudiado la producción biológica de hidrógeno por fermentación oscura utilizando azúcares simples como glucosa o sacarosa como sustratos modelo (Nandi y Sengupta, 1998; Benemann, 1996; Kapdan y Kargi, 2006; Angenent *et al.*, 2004; Hallenbeck y Benemann, 2002). Adicionalmente, se ha estudiado conversión de residuos sólidos el cual puede ser empleado para la producción sostenible de biogás (incluyendo hidrógeno y metano), ya que podría ser considerado como materia prima abundante, fácilmente disponible, de bajo costo y altamente biodegradable (Chu *et al.*, 2008; Mohan *et al.*, 2009). Estos residuos poseen un alto contenido energético, por ejemplo, contienen 85-95% de sólidos volátiles y 75-85% de humedad, lo que favorece el desarrollo microbiano (Li *et al.*, 2008a).

Existen varios métodos para el tratamiento de residuos orgánicos incluyendo el composteo, el lombricompostaje y procesos anaerobios, siendo estos últimos los que ofrecen un enfoque prometedor (Lee *et al.*, 2008) ya que adicionalmente a la eliminación de los residuos, éstos pueden ser valorizados para la producción de gases energéticos incluyendo metano e hidrógeno. Durante la producción fermentativa de hidrógeno, los carbohidratos son directamente convertidos en H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, ácidos orgánicos y alcoholes sin ninguna energía externa o aceptores de electrones, esto hace factible su producción (Kim y Shin, 2008).

## 1.2 Componentes principales de los RSO y su fermentación

### 1.2.1 Carbohidratos

Los carbohidratos pueden ser fermentados dependiendo principalmente de los microorganismos presentes. Si el hidrógeno formado durante la fermentación se permite acumular en el sistema se pueden conseguir un máximo de 2 moles  $H_2$  mol glucosa<sup>-1</sup> (Hawkes *et al.*, 2007). Bajas presiones parciales de hidrógeno ( $P_{pH_2}$ ) pueden aumentar el rendimiento del gas, principalmente por la oxidación de más productos de fermentación reducidos a acetato (Gottschalk, 1986)

Numerosos clostridos fermentan azúcares, produciéndose ácido butírico como producto final. La glucosa se convierte en piruvato a través de la vía glucolítica, y el piruvato se escinde en acetyl-CoA,  $CO_2$  y  $H_2$  a través de la reacción fosforolítica. Después, parte del acetyl-CoA se reduce a butirato u otros productos de fermentación mediante el NADH obtenido de las reacciones glucolíticas como donador de electrones (Madigan *et al.*, 2009).

Los productos de fermentación observados están influidos por la duración y las condiciones de la fermentación. Durante las primeras etapas de la fermentación butírica se produce butirato y una pequeña cantidad de acetato. A medida que disminuye el pH del medio se detiene la síntesis de los ácidos y comienzan a acumularse los productos neutros como acetona y butanol. Sin embargo, si el pH del medio se mantiene neutro mediante amortiguadores (tampones), se generan pocos productos neutros y la fermentación continúa principalmente sintetizando ácido butírico (Madigan *et al.*, 2009).

### 1.2.2 Lípidos

La degradación procede a través de una hidrólisis primaria, seguidos de  $\beta$ -oxidación. El producto final principal es acetyl-CoA y la degradación general exige una baja presión parcial de hidrógeno, <100 Pa. El glicerol y las cadenas largas de ácidos grasos resultan inhibidores para las bacterias anaerobias. Éstos se adhieren a la pared celular, lo que restringe el transporte de nutrientes. Por eso puede resultar difícil la producción de hidrógeno a partir de estas cadenas largas. Debido a que gran parte de la DQO de los



lípidos se convierte en ácidos grasos de cadena larga en la fase de hidrólisis del metabolismo anaerobio; incluso si el glicerol tiene un alto potencial de producción de hidrógeno, la generación del biogás a partir de los lípidos no es alta (Li, 2009).

### 1.2.3 Proteínas

Las proteínas se hidrolizan primero a sus respectivos aminoácidos. Estos productos son por lo general desaminados y se transforman posteriormente en ácidos grasos. Las bacterias que realizan la degradación de aminoácidos son, en gran parte, microorganismos pertenecientes al género *Clostridium*. Algunas especies *Clostridium* consiguen energía al fermentar aminoácidos. Se trata de los clostridios “proteolíticos” que degradan proteínas cuyos aminoácidos liberan y se catabolizan posteriormente. Algunas especies fermentan aminoácidos individuales. La bioquímica de estas fermentaciones es realmente compleja, pero la estrategia metabólica no. En prácticamente todos los casos, los aminoácidos se metabolizan para producir un acil-CoA derivado de ácidos grasos, típicamente acetilo (C<sub>2</sub>), butirilo (C<sub>4</sub>) o caproilo (C<sub>6</sub>), produciéndose el ATP por la fosforilación a nivel sustrato a partir de ellos. Otros productos de la fermentación de aminoácidos son el NH<sub>3</sub> y CO<sub>2</sub> (Ramsay y Pullammanappallil, 2001; Örlygsson *et al.*, 1995).

Algunos clostridios fermentan solamente un par de aminoácidos. En esta situación, un aminoácido funciona como el donador de electrones y se oxida, mientras que el otro es el aceptor de electrones y se reduce. Esta fermentación acoplada de aminoácidos se conoce como reacción de Stickland. Los productos de la fermentación de Stickland son NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> y ácido carboxílico con un carbono menos que el aminoácido que se oxidó (Li, 2009).

## 1.3 Hidrógeno (H<sub>2</sub>)

El hidrógeno (H<sub>2</sub>) proviene de las palabras griegas *hidro* y *genes* que significan “agua” y “generador”. El hidrógeno es el primer elemento en la tabla periódica, es el menos complejo y más abundante en el universo (Silk, 1994). Desempeña un papel importante en los escenarios energéticos presentes y futuros. El factor más importante que determina el papel específico de hidrógeno es probablemente la demanda de energía además de que se prevé en el futuro para reemplazar a algunos combustibles fósiles.

Las fuentes renovables de energía como la hidráulica, solar, eólica, geotérmica, de oleaje y la energía de los residuos sólidos se pueden utilizar para generar hidrógeno a partir de hidrocarburos y/o agua. Por ejemplo, 108.7 kg de hidrógeno puede ser producido a partir de 1m<sup>3</sup> de agua por electrólisis usando electricidad, y la energía de esta cantidad de hidrógeno es equivalente a 422 L de gasolina (Veziroglu y Barbir, 1998).

Los atributos del hidrógeno como vector energético se relacionan con las técnicas de producción y campos de aplicación; es limpio, renovable, ampliamente utilizado en diversas aplicaciones, producible por diferentes técnicas y de diversas fuentes (Veziroglu y Barbir, 1998). En la tabla 1.1 se presenta una comparación de la energía por unidad de masa del hidrógeno con otros combustibles.

**Tabla 1.1** Comparación de la energía por unidad de masa y emisión específica de carbono e hidrógeno comparado con otros combustibles

Tipo de combustible	Energía por unidad de masa (J/kg)	Emisión específica de carbono (kg C/kg combustible)
Hidrogeno liquido	141.9	0.00
Hidrógeno gaseoso	141.9	0.00
Aceite combustible	45.5	0.84
Gasolina	47.4	0.86
Combustible de avión	46.5	----
Metanol	22.3	0.5
Etanol	29.9	0.5
Biodiesel	37	0.5
Gas natural	50	0.46
Carbón	30	0.5

Veziroglu y Barbir, 1998 y Contreras *et al.*, 1997

En la actualidad, 40% de H<sub>2</sub> se produce a partir de gas natural, 30% a partir de aceites pesados y de nafta, 18% a partir de carbón, y 4% de electrólisis y alrededor de 1% se produce a partir de biomasa (Das, 2009). Para lograr una penetración significativa de hidrógeno en sistemas de energía en el futuro, los métodos de producción, distribución, almacenamiento y utilización deben mejorarse drásticamente más allá de su rendimiento presente, fiabilidad y costo (Das, 2009).

Debido a que la necesidad de energía a nivel mundial ha ido en aumento, las investigaciones de estrategias alternativas de generación de energía se han convertido

recientemente en tema importante de investigación. La propiedad más importante de las fuentes de energía alternativas es su compatibilidad ambiental. En línea con esta característica, el hidrógeno probablemente es uno de los vectores energéticos más atractivos. En la tabla 1.2 se muestran las ventajas y desventajas a tener presentes en este y otros futuros escenarios.

**Tabla 1.2** Ventajas y desventajas del hidrógeno, H<sub>2</sub> (Edwards *et al.*, 2008)

<b>Ventajas</b>	
<input checked="" type="checkbox"/>	El H <sub>2</sub> es un producto no tóxico, vector energético con una alta energía específica ( <i>e. g.</i> el contenido de energía de 1 kg de hidrógeno es equivalente a la de 2.6 kg de gasolina)
<input checked="" type="checkbox"/>	Puede ser utilizado como un medio de almacenamiento de la electricidad generada a partir de recursos renovables intermitentes, como la energía solar, el viento, las olas y de las mareas.
<input checked="" type="checkbox"/>	La combustión del H <sub>2</sub> no produce emisiones de gases tóxicos, excepto en algunas relaciones de equivalencia (cuando altas temperaturas pueden dar lugar a importantes niveles de NO <sub>x</sub> en los productos de escape).
<input checked="" type="checkbox"/>	A pesar de su reputación percibida, el H <sub>2</sub> tiene un historial de seguridad extraordinario durante muchas décadas de uso en aplicaciones industriales.
<b>Desventajas</b>	
<input checked="" type="checkbox"/>	Actualmente, la mayor cantidad del hidrógeno comercial se extrae tradicionalmente de los combustibles fósiles (habitualmente hidrocarburos) por medio de procesos químicos. Lo cual continúa con la problemática existente del uso de combustibles fósiles.
<input checked="" type="checkbox"/>	La producción comercial de H <sub>2</sub> por electrólisis del agua alcanza una eficiencia del 70-75%. Sin embargo, el costo de H <sub>2</sub> producido por esta ruta es varias veces mayor que la producida a partir de combustibles fósiles.
<input checked="" type="checkbox"/>	Las fuentes renovables de energía (por ejemplo, eólica, mareomotriz, biomasa) pueden proporcionar las fuentes locales de H <sub>2</sub> , pero desde luego no cumplir con los enormes volúmenes de H <sub>2</sub> requeridos a nivel mundial para la nueva fuente de energía.
<input checked="" type="checkbox"/>	Una de las barreras tecnológicas cruciales para el uso generalizado del H <sub>2</sub> como vector energético efectivo es la falta de un método de almacenamiento seguro, de bajo peso y bajo costo con una alta densidad de energía.

Nota: Para más información se puede consultar la hoja de seguridad del H<sub>2</sub> en <http://www.sigmadrich.com/mexico.html>

## 1.4 Proceso anaerobio

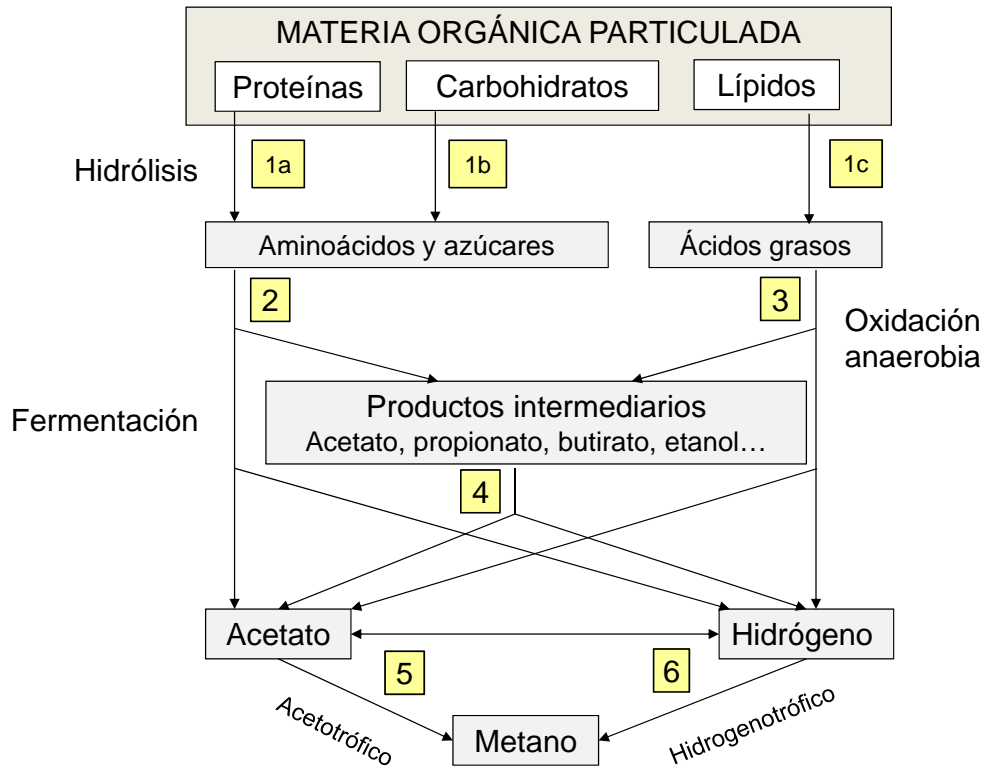
Las primeras etapas de este proceso son la hidrólisis y la acidogénesis, en las que está implicada la fermentación oscura con productores de hidrógeno. Entonces el hidrógeno, como un producto intermedio clave, puede ser consumido rápidamente por otros microorganismos en un cultivo mixto, principalmente por homoacetógenos, metanógenos y bacterias sulfato reductoras (Das y Veziroglu, 2008; Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009 y Chen *et al.*, 2008a).

Gujer y Zenhder (1983) propusieron seis etapas por las cuales se lleva a cabo el proceso anaerobio (figura 1.1):

1. Hidrólisis de polímeros complejos
  - 1a. Hidrólisis de proteínas
  - 1b. Hidrólisis de carbohidratos
  - 1c. Hidrólisis de lípidos
2. Fermentación de azúcares y aminoácidos
3. Oxidación anaerobia de los ácidos grasos de cadena larga y alcoholes
4. Oxidación anaerobia de productos intermedios tales como los ácidos grasos volátiles (con la excepción de acetato)
5. Conversión de acetato a metano
6. Conversión de hidrógeno a metano

Los biopolímeros tales como proteínas, carbohidratos y lípidos se hidrolizan primero a sus respectivos monómeros orgánicos que pueden ser utilizados ya sea como sustratos por organismos fermentativos (aminoácidos, azúcares) o por oxidantes anaerobios (ácidos grasos). Los productos de estas reacciones de degradación son acetato e hidrógeno o compuestos intermediarios tales como los ácidos volátiles (propionato, butirato) que también son precursores de metano (Gujer y Zenhder, 1983).

Las reacciones microbiológicas son autocatalíticas, lo que significa que, en el estado estacionario, el catalizador para una reacción mediada biológicamente se produce en un grado tal que la cantidad de catalizador presente no limitará la velocidad de una reacción; más bien, el sustrato o la concentración de nutrientes serán la limitación de velocidad. Por lo tanto, en una comunidad compleja, tal como la encontrada en un digestor anaerobio, el número de individuos de cada grupo de microorganismos será proporcional al flujo del sustrato correspondiente en el sistema (Gujer y Zenhder, 1983).



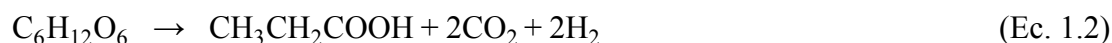
**Figura 1.1** Esquema de reacción propuesto para la digestión anaerobia. Adaptado de Gujer y Zehnder (1983).

## 1.5 Producción de H<sub>2</sub> por medio de la fermentación oscura

Una variedad de microorganismos, incluyendo bacterias, *arqueas* y levaduras, en un amplio rango de temperaturas, son capaces de producir hidrógeno por fermentación oscura. En el caso de la producción de hidrógeno es necesario inhibir la fase metanogénica, con lo cual el proceso anaerobio es limitado a la producción de hidrógeno, ácidos grasos volátiles, acetato y otros compuestos orgánicos como lactato y alcoholes (Nandi y Sengupta, 1998; de Vrije y Claassen, 2003).

Entre la amplia gama de productos finales generados por los diferentes metabolismos microbianos, se acumula ácido acético de la fermentación como resultado único con una producción teórica de 4 mol H<sub>2</sub> por mol de glucosa<sup>-1</sup>, equivalente a 498 mL H<sub>2</sub> glucosa<sup>-1</sup> (0 °C, 1 atm); mientras que en la vía butirato, un menor rendimiento molar del hidrógeno se

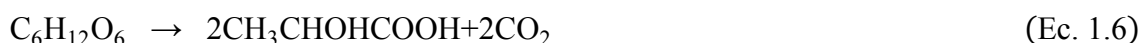
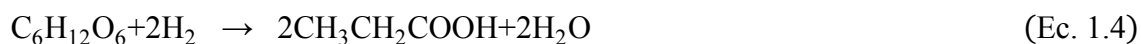
observa con 2 mol H<sub>2</sub> mol de glucosa<sup>-1</sup>, equivalente a 249 ml H<sub>2</sub> glucosa<sup>-1</sup> (0 °C, 1 atm), ecuaciones 1.1 y 1.2 (Hawkes *et al.*, 2007).



Sin embargo, la acumulación de acetato en el medio no implica necesariamente una mayor producción de hidrógeno ya que varias especies microbianas pueden convertir H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en acetato (ecuación 1.3). Dichas especies incluyen microorganismos acetógenos que reducen el CO<sub>2</sub> a acetato mediante la vía acetyl Co-A. Los acetógenos como *Acetobacterium woodii* y *Clostridium aceticum* pueden crecer de manera quimioorganótrofa y autótrofa con la reducción del CO<sub>2</sub> a acetato con H<sub>2</sub> como donador de electrones. La mayor parte de las bacterias acetógenas que producen y excretan acetato en el metabolismo energético son grampositivas, y muchas son especies de los géneros *Clostridium* o *Acetobacterium* (Madigan *et al.*, 2009).



En cultivos mixtos, el propionato, etanol, y ácido láctico también se pueden acumular. El propionato es un metabolito que consume H<sub>2</sub>, mientras que el etanol y el ácido láctico están implicados en una vía de nulo consumo de H<sub>2</sub> (ecuaciones 1.4, 1.5 y 1.6). Nandi y Sengupta (1998) enlistaron a las principales bacterias anaerobias productoras de hidrógeno (*Clostridium*), géneros facultativos (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*) y géneros aerobios (*Alcaligenes*, *Bacillus*).



## 1.6 Microorganismos productores de H<sub>2</sub>

Para producir hidrógeno es necesario inhibir a los microorganismos que lo consumen (*archeas* metanogénicas, bacterias sulfato reductoras [BSR] y bacterias ácido lácticas [BAL]). Para realizar esto se emplean pretratamientos químicos o térmicos con el fin de seleccionar un inóculo productor de hidrógeno. Una amplia gama de fuentes microbianas se ha utilizado para obtener inóculos para la producción de hidrógeno, entre ellos lodos anaerobios de plantas de tratamiento de aguas residuales de estiércol de vaca (Chu *et al.*, 2008; Wan y Zhao, 2009; O-Thong *et al.*, 2008 y Tang *et al.*, 2008), ganado productor de leche (Fan *et al.*, 2004 y 2006), lodos de aguas residuales provenientes de molinos de aceite de palma (Vijayaraghavan *et al.*, 2006 y Chong *et al.*, 2009), suelo, composta de paja de arroz, harina de soya fermentada (Noike *et al.*, 2002), así como lixiviados de rellenos sanitarios (Li *et al.*, 2008a y Karlsson *et al.*, 2008). Akutsu *et al.*, (2008) demostraron que el origen del inóculo afecta al rendimiento global del biorreactor.

Para la producción de hidrógeno a partir de cultivos mixtos, se han aislado una amplia gama de especies, específicamente del género *Clostridium* (*C. pasteurianum*, *C. saccharobutylicum*, *C. butyricum*), *Enterobacter* (*E. aerogenes*) y *Bacillus* bajo condiciones mesofílicas; y del género *Thermoanaerobacterium* (*T. thermosaccharolyticum*), *Caldicellulosiruptor* (*C. saccharolyticus*, *C. thermocellum*) y, *Bacillus thermozeamaize* bajo temperaturas termofílicas (Chang *et al.*, 2008; Hawkes *et al.*, 2002; Karakashev *et al.*, 2009; Ivanova *et al.*, 2009 y O-Thong *et al.*, 2008). Bajo condiciones mesofílicas se han encontrado principalmente bacterias esporuladoras del género *Clostridium* en mezclas mixtas expuestas a inóculos sometidos a pretratamientos de choque térmico (Kim *et al.*, 2008).

Por ejemplo, *Clostridium* spp. carece de cadena respiratoria y obtiene su ATP exclusivamente mediante fosforilación a nivel de sustrato. Se conocen numerosos mecanismos anaerobios de producción de energía en *Clostridium*. Algunos de éstos fermentan azúcares, produciendo ácido butírico como principal producto final. Algunos también producen acetona y butanol (Madigan *et al.*, 2009). Un grupo distinto de *Clostridium* fermenta celulosa produciendo alcoholes y probablemente estos sean los

organismos responsables de la mayoría de la descomposición anaerobia de celulosa en el suelo. *Clostridium* spp. ha demostrado ser un productor típico de H<sub>2</sub> el cual fermenta carbohidratos C<sub>n</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> a acetato (CH<sub>3</sub>COOH↔CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>+H<sup>+</sup>), butirato (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidrógeno, dióxido de carbono y solventes orgánicos. *Clostridium butyricum* (Chong, 2009), *Clostridium acetobutyricum*, *Clostridium beijerinckii* (Lin *et al.*, 2007), *Clostridium thermolacticum* (Collet *et al.*, 2004), *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Ferchichi *et al.*, 2005), *Clostridium tyrobutyricum* (Jo *et al.*, 2008), *Clostridium thermocellum* (Levin *et al.*, 2004) y *Clostridium paraputrificum* (Evvyernie *et al.*, 2000) son ejemplares de bacterias anaerobias formadoras de espora que producen hidrógeno.

Existen dos vías para producir el hidrógeno que son: **1)** vía butirato y **2)** vía acetato. Teóricamente, 4 moles de H<sub>2</sub> se pueden producir a partir de un mol de glucosa vía acetato y 2 moles de H<sub>2</sub> se pueden producir a partir de un mol de glucosa vía butirato (tabla 1.3) relación que se debe considerar para manipular la dirección de estas vías metabólicas.

**Tabla 1.3** Importantes procesos bioquímicos en consorcios anaerobios y metanogénicos (adaptado de Madigan *et al.*, 2009)

Tipo de reacción	Reacción	Energía libre de Gibbs (kJ/mol)	
		ΔG <sup>0</sup> <sup>(a)</sup>	ΔG' <sup>(b)</sup>
1. Fermentación de carbohidratos a butirato	Glucosa+2H <sub>2</sub> O →2H <sub>2</sub> +Butirato+2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +3H <sup>+</sup>	-135	-284
2. Fermentación de carbohidratos a acetato	Glucosa+4H <sub>2</sub> O →4H <sub>2</sub> +2Acetato+2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +4H <sup>+</sup>	-207	-319
3. Oxidación anaerobia del butirato (sintrofismo) <sup>(c)</sup>	Butirato+2H <sub>2</sub> O →2H <sub>2</sub> +2Acetato+H <sup>+</sup>	+48.2	-17.6
4. Oxidación anaerobia del propionato (sintrofismo) <sup>(d)</sup>	Propionato+3H <sub>2</sub> O →3H <sub>2</sub> +Acetato+HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +H <sup>+</sup>	+76.2	-5.5
5. Metanogénesis hidrogenotrófica	4H <sub>2</sub> +HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +H <sup>+</sup> →CH <sub>4</sub> +3H <sub>2</sub> O	-136	-3.2
6. Acetogénesis del CO <sub>2</sub> e H <sub>2</sub>	4H <sub>2</sub> +2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +H <sup>+</sup> →Acetato+4H <sub>2</sub> O	-105	-7.1
7. Sulfato reducción	4H <sub>2</sub> +SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> →HS <sup>-</sup> +3H <sub>2</sub> O+OH <sup>-</sup>	ND	-165
8. Propionato a partir de glucosa <sup>(e)</sup>	3Glucosa →4Propionato+2Acetato+2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +8H <sup>+</sup>	ND	-1016

(a) Condiciones estándar: especies solubles 1M, gas 1 atm de presión. (b) Condiciones donde prevalecen ecosistemas anaerobios, por ejemplo [ácidos orgánicos] 1mM, pH = 7, [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] = 20 mM, [Glucosa] = 10 mM, y los procesos parciales de H<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> son de 10<sup>-4</sup> y 0.6 atm, respectivamente. Los valores negativos de la energía libre de Gibbs indican un proceso espontáneo, termodinámicamente posible (exergónico), mientras que los valores positivos indican un proceso imposible (endergónico). (c) Típicamente efectuada por géneros *Syntrophomonas*. (d) Típicamente efectuada por géneros *Syntrophobacter*. (e) Se supuso una vía homofermentativa láctica a partir de la glucosa (Madigan *et al.*, 2009) y una subsecuente fermentación del ácido láctico a ácido propiónico típicamente afectado por *Propionibacterium*. **ND**, no disponible



En la práctica, cuando el flujo de carbono a partir de glucosa está dirigido hacia la producción de acetato, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, la producción máxima es de 3.0-3.3 mol H<sub>2</sub> mol glucosa<sup>-1</sup> (Chen *et al.*, 2006) pero, cuando se desvía hacia propionato, la productividad es de 1.7 mol H<sub>2</sub> mol glucosa<sup>-1</sup>. En cambio, cuando la degradación de la glucosa es derivada hacia lactato, etanol, acetato, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, la producción máxima de hidrógeno que se puede alcanzar es de 2.0-2.9 mol H<sub>2</sub> mol glucosa<sup>-1</sup> (Chen *et al.*, 2006).

## 1.7 Modelo de Gompertz. Cinética del proceso de producción de hidrógeno

Este modelo ha sido modificado para estimar la producción de hidrógeno acumulado en el procesos de fermentación anaerobia (van Ginkel *et al.*, 2001; Lin y Lay, 2004). La cantidad de hidrógeno obtenido por procesos fermentativos se puede cuantificar en términos de rendimiento y tasa. El rendimiento se define como la cantidad de H<sub>2</sub> producido por cantidad de sustrato consumido y se expresa en unidades de mol H<sub>2</sub> mol glucosa<sup>-1</sup>. La tasa de producción de hidrógeno (TPH) se define como la cantidad de H<sub>2</sub> (mL) producido por unidad de tiempo y por unidad de volumen del reactor (tasa volumétrica) o por unidad de biomasa (tasa específica) (Argun y Kargi, 2011). Es importante mencionar que es posible ajustar matemáticamente la producción de hidrógeno por fermentación oscura mediante la ecuación modificada de Gompertz (ecuación 1.7), el cual es un modelo adaptado para describir el progreso acumulativo de producción de H<sub>2</sub> en un experimento batch, tal como se evalúa en este trabajo.

$$H(t) = H_{max} * \exp \left[ -\exp \left( \frac{R_{max}(\lambda - t)}{H_{max}} + 1 \right) \right] \quad (\text{Ec. 1.7})$$

Donde, H corresponde a la producción acumulada de H<sub>2</sub> (mL), H<sub>max</sub> a la producción acumulada máxima de H<sub>2</sub> (mL), R<sub>max</sub> la tasa de producción máxima de H<sub>2</sub> (mL/h), t el tiempo del cultivo (h) y λ fase de latencia (h) requerido para comenzar la evolución del H<sub>2</sub>. Esta ecuación ha sido empleada por diferentes autores (Zhang *et al.*, 2003; Lay *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2008b, Gadhamshetty *et al.*, 2010 y Buitón y Carvajal, 2010) con buenos

ajustes de  $r^2 > 0.90$ , donde se ha querido correlacionar resultados experimentales con un modelo matemático de tipo predictivo.

## 1.8 Principales microorganismos consumidores de H<sub>2</sub>

### 1.8.1 Bacterias sulfato reductoras (BSR)

La reducción del sulfato se asocia con el crecimiento de las bacterias sulfato reductoras (BSR) que utilizan H<sub>2</sub> o materia orgánica y sulfato como donantes y aceptores de electrones, respectivamente (Odom y Singleton, 1992). Es bien conocido que la metanogénesis, como un paso terminal, puede ser influenciada de manera significativa por el sulfuro producido a partir de la reducción del sulfato. Una alta concentración de sulfuro de hidrógeno libre puede dar lugar a la inhibición de la metanogénesis (Parkin *et al.*, 1990). Durante la metanogénesis, como etapa terminal de la degradación anaerobia, se nota particularmente la competencia entre BSR y las *archeas* productoras de metano (APM) (Yoda *et al.*, 1987). Las BSR compiten con las APM por el acetato y el H<sub>2</sub> (precursores de metano más importantes). Se ha informado que las BSR podrían competir con las bacterias acetogénicas productoras de H<sub>2</sub> para los sustratos tales como butirato (Mizuno *et al.*, 1994), propionato (Parkin *et al.*, 1990; Uberoi y Bhattacharya, 1995) y benzoato (Li *et al.*, 1996).

De acuerdo con la termodinámica, la reacción bioquímica más eficiente usando hidrógeno implica a los microorganismos sulfato/nitrato-reductores ( $\Delta G^0 = -165 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), incluso a una concentración de hidrógeno baja (0.02 ppm) en presencia de sulfato o nitrato (Cord-Ruwisch *et al.*, 1988). Tiempos de residencia hidráulica (TRH) cortos no son suficientes para inhibir estos microorganismos. Incluso a un TRH de 2 h, la transferencia de metabolitos entre especies tales como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y AGVs, son consumidos inmediatamente por las BSR bajo condiciones ricas en sulfato (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009). Para TRH largos, el hidrógeno es convertido en metano y CO<sub>2</sub> por *archeas* productoras de metano (APM) bajo condiciones de limitación de sulfato. En caso de una presencia abundante de sulfatos en el sustrato, existirá una mayor afinidad para que el proceso se lleve a cabo bajo la vía de la sulfatorreducción (Mizuno *et al.*, 1998). Junto con la concentración de sulfato y el TRH, el pH es un factor clave en la reducción de sulfato.

Valores de pH < 6 inhibe significativamente la actividad de las bacterias sulfato reductoras (Lin y Chen, 2006 y Mizuno *et al.*, 1998).

### **1.8.2 *Archeas* productoras de metano (APM)**

Son considerados como los principales microorganismos que consumen hidrógeno en ambientes anaerobios. Fisiológicamente los metanógenos son anaerobios y para su aislamiento se requieren técnicas en rigurosa ausencia de oxígeno. Según la especie, el cultivo de metanógenos puede llevarse a cabo en un medio con sales minerales a 1 atm de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (proporción 4:1) o bien, en medios complejos. La mayoría de los metanógenos conocidos son mesófilos y no halófilos, aunque también se han descubierto especies extremófilas que presentan un crecimiento óptimo a muy altas o bajas temperaturas, concentraciones altas de sal o pH extremo (Madigan *et al.*, 2009).

En este proyecto se busca la inhibición de esta fase de metanogénesis, para ello se conocen diversas opciones para controlar este proceso. Entre estos métodos destacan la inhibición química, control de pH, tratamiento térmico del inóculo y tiempos cortos de retención hidráulica (TRH). Los inhibidores químicos más comúnmente utilizados son bromoetanosulfonato (BES), acetileno y cloroformo. BES es un compuesto específico contra metanógenos y actúa como un análogo de la coenzima M en la cadena respiratoria. Sin embargo, el tratamiento con concentraciones efectivas de BES no es amigable con el ambiente y resulta demasiado costoso para operaciones a gran escala. El pH es también un factor en la prevención de la actividad metanogénica ya que la mayoría de estas *archeas* sólo puede crecer en un estrecho rango de pH 6-8. El tratamiento más común del inóculo es el choque térmico (~ 100 °C, 10 min) para seleccionar a aquellos microorganismos formadores de esporas (bacterias productoras de H<sub>2</sub>). Los metanógenos no esporulan y no sobreviven a tales condiciones. Estos últimos presentan bajas tasas de crecimiento (aproximadamente 0.2 h<sup>-1</sup>).

### **1.8.3 Bacterias ácido lácticas (BAL)**

Noike *et al.*, (2002) estudiaron la inhibición en la producción de H<sub>2</sub> por las bacterias del ácido láctico (BAL). Ellos observaron la sustitución de la fermentación de H<sub>2</sub> por

fermentación de ácido láctico cuando dos cepas de bacterias del ácido láctico, *Lactobacillus paracasei* y *Enterococcus durans*, se cultivaron con dos cepas productoras de H<sub>2</sub>, *Clostridium acetobutylicum* y *C. butyricum*. La secreción de bacteriocinas se reconoce como efecto inhibitorio y se propusieron temperaturas por encima de 50 ° C para evitar la influencia de las BAL (Noike *et al.*, 2002).

En los sistemas de mesófilos, el crecimiento de BAL no podría ser limitado por la temperatura, y la acumulación de ácido láctico condujo a la inestabilidad de los procesos de cultivo mixtos. En efecto, Wang y Zhao (2009), mostraron que el ácido láctico inhibe la fermentación de H<sub>2</sub> en un sistema continuo de dos etapas usando los residuos de alimentos como sustrato.

#### **1.8.4 Bacterias homoacetogénicas (BHA)**

Son microorganismos anaerobios que catalizan la formación de acetato a H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Diekert y Wohlfarth (1994) emplearon *Clostridium aceticum* y *Clostridium thermoaceticum* como especies modelo utilizadas para dilucidar su vía metabólica. Estos poseen enzimas especiales que catalizan la formación de acetyl-Co A que es convertido a acetato en el catabolismo de carbono. Las HAB son anaerobios versátiles, que convierten una variedad de sustratos diferentes en acetato como el principal producto final (Diekert y Wohlfarth, 1994). Desafortunadamente, el tratamiento previo del inóculo por calentamiento para seleccionar bacterias formadoras de esporas no es adecuado para la inhibición de las HAB ya que algunas de ellas pertenecen al género *Clostridium* (Oh *et al.*, 2003). Por tanto, sólo ciertos parámetros de operación podrían favorecer la producción de hidrógeno, por ejemplo, mediante la eliminación de CO<sub>2</sub> del espacio libre de cabeza (Park *et al.*, 2005).

### **1.9 Inhibidores químicos de la metanogénesis y sus aplicaciones**

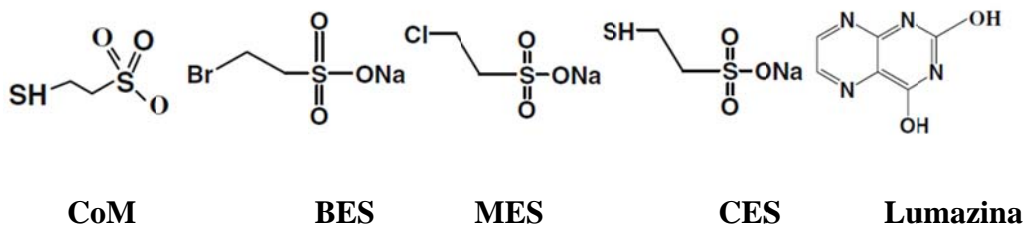
La aplicación de inhibidores químicos para los microorganismos metanógenos pueden dividirse en dos grandes grupos: inhibidores “específicos” y “no específicos”. El primer grupo incluye los análogos estructurales de la coenzima M e inhibidores de la HMG-CoA. El grupo de los “no específicos” incluye diversos productos químicos que pueden limitar o anular la actividad de metanógenos y no-metanógenos. Los inhibidores químicos de la

metanogénesis se han utilizado ampliamente en los campos de la producción y el consumo de metano (cultivo puro o medio natural) y la producción de sustancias de valor añadido, tales como los AGVs e H<sub>2</sub> (Liu *et al.*, 2011).

Alternativamente, los precursores metanogénicos, como ácidos grasos volátiles (AGVs) e H<sub>2</sub>, producidos en la etapa de acidogénesis, han recibido considerable atención debido a sus altos costos y las aplicaciones industriales que de ellos se derivan (Kleerebezem y van Loosdrecht, 2007; Sauer *et al.*, 2008; Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009). Existen informes de diversos productos químicos que inhiben la formación de metano (*arqueas* metanogénicas) con diferentes especificidades y concentraciones óptimas de uso (Gonzalez *et al.* 2006; Ungerfeld *et al.* 2004; Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009). Estos inhibidores han sido utilizados para entender las interacciones ecológicas entre metanógenos y otros grupos microbianos mineralizantes de carbono, así como el flujo de carbono y electrones en diversos ambientes anóxicos (Wüst *et al.* 2009; Orcutt y Meile, 2008).

### **1.9.1 Categoría y características de los inhibidores de la metanogénesis**

*Análogos estructurales de la coenzima M.* La coenzima M (CoM; HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) es un cofactor que se encuentra en todos los metanógenos pero no en otras bacterias ni *archeas* (Liu y Whitman, 2008). La CoM está implicada en la etapa terminal de la biosíntesis de metano, donde se reduce el grupo metilo por CoM a metano por la metil-CoM reductasa. Los inhibidores de metanógenos incluidos en este grupo normalmente son el 2-bromoetilsulfonato (BES), 2-cloroetanosulfonato (CES), 2-mercaptoetanosulfonato (MES) y la lumazina. Ellos pueden inhibir competitivamente la reacción de transferencia de metilo en la etapa terminal reductora durante la formación de metano en metanógenos utilizando H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Normalmente, estas sustancias pueden inhibir específicamente todos los grupos de metanógenos en una concentración relativamente baja. La figura 1.2 muestra las estructuras químicas de la CoM y sus análogos estructurales.



**Figura 1.2** Estructura de la CoM de los metanógenos y sus análogos estructurales

*Lumazina* [2, 4-(1H, 3H)-pteridinediona]. Se ha informado que el compuesto pterin lumazina inhibe el completo crecimiento de varias *archaeas* metanogénicas a una concentración  $\leq 0.6$  mM y fue bactericida para *Methanobacterium thermoautotrophicum* cepa Marburg (Nagar-Anthal *et al.*, 1996). Es un análogo estructural de las porciones de folatos y flavinas y de algunos de los cofactores de la metanogénesis (formas reducidas; deazaflavina F<sub>420</sub>). Algunos pterinas (tal como la lumazina) han demostrado ser importantes compuestos antibacterianos (Blakely 1969). Para obtener más información sobre el efecto de este compuesto, fueron probados en su efectividad con lumazina, una gran cantidad de microorganismos que representan los dominios *Archaea*, *Bacteria*, *Eukarya* y varios grupos metabólicos dentro de ellos, (Woese *et al.*, 1990).

*Hidrocarburos alifáticos halogenados*. El Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) se sabe que bloquea la función de las enzimas corrinóide y de la metil-coenzima reductasa M (Oremland y Capone, 1998). Es también capaz de inhibir la producción de CH<sub>4</sub> a partir de ambos H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y acetato; es decir, metanógenos acetoclásticos e hidrogenotróficos.

Un número de aplicaciones exitosas se han establecido al utilizar cloroformo y otros compuestos como inhibidores de la metanogénesis, entre ellos la selección de consorcios mixtos a partir de biomasa microbiana de residuos para la producción de hidrógeno (Hu y Chen, 2007; Kaushik y Debabrata, 2004), en la tabla 1.4 se resumen algunas de las aplicaciones comerciales que se han llevado a cabo utilizando diversos inhibidores químicos.

**Tabla 1.4** Aplicaciones de inhibidores químicos metanogénicos

Inhibidor químico	Objetivo de aplicación	Condiciones de la prueba y resultados	Referencia
BES	Mejorar de la acumulación de acetato y tratamiento de lodo productor de H <sub>2</sub>	BES triplicó de acumulación de acetato comparado con el grupo control evaluado e inhibió específicamente los metanógenos, pero no encontró efectos significativos en la producción de H <sub>2</sub>	Chen <i>et al.</i> , (2007); Zhu y Beland (2006)
BES, lumazina y ácido propiónico	Disminuir la pérdida de energía digestible para rumiantes	BES y lumazina a 1.2 mM incrementó la producción microbiana de N <sub>2</sub> en un 17%. El ácido propiónico a 2 mM aumentó en un 33%. Metanógenos ruminales tales como <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> , <i>Methanosarcina mazei</i> y <i>Methanomicrobium mobile</i> tienen diferentes sensibilidades para el BES y sus inhibidores análogos	Ungerfeld <i>et al.</i> , (2004)
CHCl <sub>3</sub> y BES	Investigar la contribución de las diferentes clases de metanógenos para la producción de metano	La aplicación de las combinaciones de inhibidores selectivos puede ser útil para dilucidar las vías metabólicas anaeróbicas en cultivos microbianos mixtos y las comunidades microbianas naturales	Conrad <i>et al.</i> , (2000)
CHCl <sub>3</sub>	Mejorar la producción de H <sub>2</sub>	0.05%, 11.6 L/L/día y un TRH 5.3 h era el método más eficaz para proporcionar lodos productores de H <sub>2</sub>	Hu y Chen (2007)

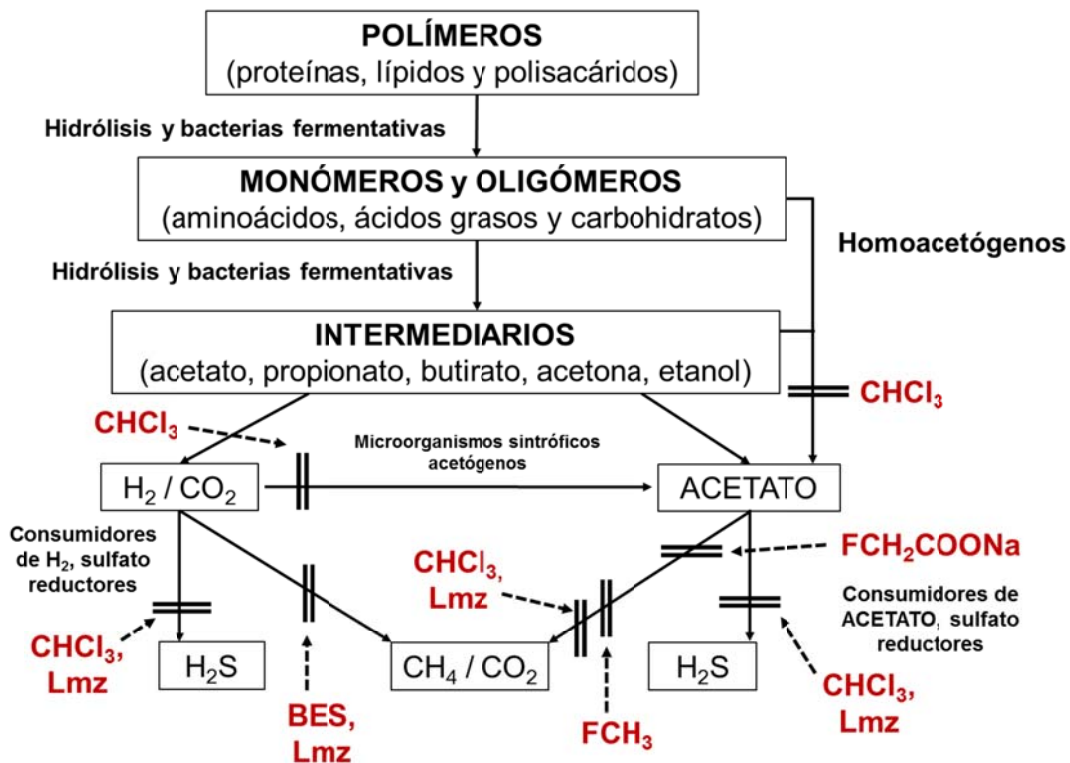
BES (2-bromoetanosulfonato) o (BrCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)

CHCl<sub>3</sub> Cloroformo

Aunque la inhibición de la metanogénesis por CHCl<sub>3</sub> en ambientes anaerobios ha sido bien establecida, la mayoría de los estudios sólo se centra en las aplicaciones prácticas. Poco se sabe acerca de su efecto *in situ* o en la diversidad de la comunidad microbiana específica en ambientes naturales para lograr la disminución de la producción de metano (Zinder *et al.*, 1984).

Por otro lado, diversas fuentes han demostrado que CHCl<sub>3</sub> no sólo limita la actividad de *archaea* metanogénicas, sino también la actividad de las bacterias consumidoras de acetato y bacterias reductoras de sulfato (Scholten *et al.*, 2000). Las bacterias sulfato reductoras sólo se inhiben si se degradan por la vía de acetato (acetil-CoA), pero no a través del ciclo del ácido tricarboxílico.

El cloroformo ha sido también utilizado como tratamiento innovador para convertir directamente gránulos metanogénicos a gránulos productores de hidrógeno (Hu y Chen, 2007). Así, el  $\text{CHCl}_3$  se utiliza a menudo para inhibir la metanogénesis, homoacetogénesis, y la actividad de las bacterias sulfato reductoras (DeGraaf *et al.*, 1996; Scholten *et al.*, 2000; Chidthaisong y Conrad, 2000). La figura 1.3 muestra los sitios de acción de distintos inhibidores químicos empleados para evitar la producción de metano en el proceso de digestión anaerobia.



**Figura 1.3** Descripción de las vías de inhibición de varios compuestos químicos utilizados frecuentemente y la cadena anaerobia para la conversión de materia orgánica a metano:  $\text{CHCl}_3$  (cloroformo), BES (2-bromoetilsulfonato),  $\text{FCH}_2\text{COONa}$  (fluoroacetato),  $\text{FCH}_3$  (fluoruro de metilo), Lmz (Lumazina), (Liu *et al.*, 2011)

Sin embargo, cabe destacar que el uso de compuestos inhibidores para la producción de  $\text{H}_2$  puede resultar ser una contradicción ambiental ya que estas sustancias poseen moléculas halogenadas en su estructura y, su aplicación sobre el sustrato sólido/líquido, genera problemas para su disposición final y/o eliminación (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo,



2009). Parte esencial de este trabajo radica en la evaluación de la efectividad de inhibidores químicos de la metanogénesis con cloroformo y lumazina. Por tratarse de residuos de manejo especial y peligrosos (especialmente el cloroformo), para fines de tratamiento y disposición de ambos inhibidores se procedió conforme lo establecido en la NOM-052-SEMARNAT-2005, al final de las pruebas realizadas en este estudio.

## **1.10 Producción de H<sub>2</sub> por medio de cultivos mixtos**

Con el fin de obtener la producción de H<sub>2</sub> empleando residuos como sustrato, se ha explorado el uso de cultivos mixtos. Esto se ha realizado eliminando los microorganismos metanogénicos del proceso, asistido por medio de tratamientos del inóculo como choque térmico o métodos de tratamiento ácido, ya que la mayoría de los microorganismos productores de H<sub>2</sub> presenta un mecanismo de defensa (esporas) capaces de resistir a ambientes adversos (Zhang *et al.*, 2005). Cuando se utiliza como inóculo un consorcio microbiano indefinido para la producción de H<sub>2</sub>, es necesario seleccionar los microorganismos, proporcionando las mejores condiciones de desarrollo para éstos. Las metodologías empleadas son:

### **1.10.1 Inhibición ácida y cambios de pH**

Durante el proceso de acidogénesis, el hidrógeno no es el único producto que se forma sino también acetato, butirato y etanol son generados al mismo tiempo (Lee *et al.*, 2002). Cuando los cultivos son alimentados con altas concentraciones de carbohidratos, también se producen altas cantidades de ácidos que, a su vez, inhibirán la producción de hidrógeno. Así, bajo ciertas condiciones de pH ácido, la evolución del metano se detiene e H<sub>2</sub> yCO<sub>2</sub> son los principales gases producidos. La mayoría de los metanógenos crecen en un rango relativamente estrecho (6-8). De esta forma, pH bajos (crecano a 5.5), resultan efectivos para inhibir la actividad metanogénica.

### **1.10.2 Control por medio de la tasa de dilución y TRH**

Se ha demostrado la inhibición de la metanogénesis mediante un control de las condiciones operacionales, como una alta tasa de dilución para lograr el lavado de la biomasa metanogénica, presenta una menor velocidad específica de crecimiento que las bacterias productoras de hidrógeno, por lo cual se requiere de bajos tiempos de residencia de la biomasa, y/o mantener un pH ácido en el reactor o una alta concentración de AGVs. El tiempo de residencia hidráulica (TRH) y de la biomasa varía entre 3 a 240 horas, razón por la cual no se ha podido esclarecer el TRH adecuado para mantener una producción constante. La ausencia de crecimiento de microorganismos consumidores de hidrógeno dependerá de mantener adecuadas condiciones de operación del reactor (Li y Fang, 2007; Nath y Das, 2004; Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009).

La agitación continua de los reactores puede ser utilizada como selección de población microbiana cuya tasa de crecimiento es capaz de mantenerse en valores estables con la dilución causada por el flujo volumétrico constante. En este sentido, solo las poblaciones con tasa de crecimiento mayor que la tasa de dilución pueden permanecer en el reactor ( $\mu_{max} > D$ ). Basado en esto, altas tasas de dilución (bajo TRH) pueden ser empleados para causar el lavado completo de los metanógenos ya que la proporción específica de crecimiento de éstos es mucho menor que la de aquellos microorganismos productores de  $H_2$  (0.016 y 0.083 por hora, respectivamente).

El patrón de fermentación de  $H_2$  pueden cambiar a la fermentación metanogénica si el TRH aumenta. Con base en los resultados de Chen *et al.* (2001) una tasa de dilución  $< 0.172 \text{ h}^{-1}$  (o TRH  $> 6 \text{ h}$ ) es recomendada. Se ha observado a través de diferentes reportes (Ueno *et al.*, 1996; Lin y Chang, 1999; Chen *et al.*, 2001 y Han y Shin, 2004) que, a pesar de las diferencias entre la experimentación (sustrato, tipo de inóculo y temperatura), la tendencia es constante: a altos TRH la tasa de producción de  $H_2$  se disminuye con un valor crítico de 6 h.

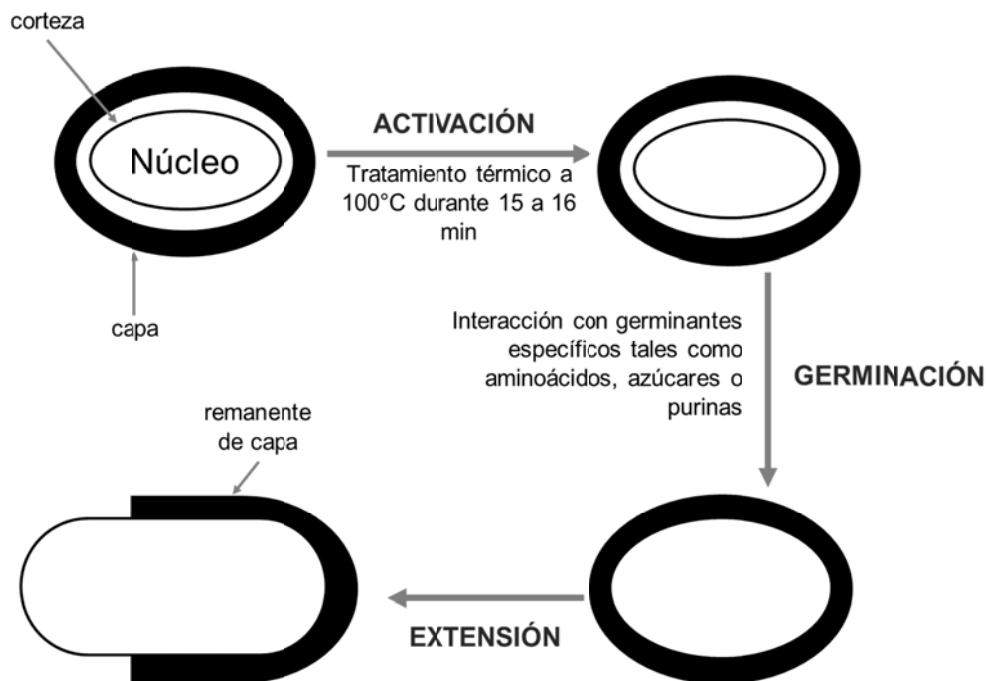
### 1.10.3 Tratamiento térmico

En ambientes anaerobios los principales microorganismos formadores de esporas son varios géneros de bacterias acidogénicas. Este hecho ha sido utilizado por varios autores para eliminar microorganismos no formadores de esporas, principalmente metanógenos, por medio de un tratamiento térmico, típicamente a 100 °C durante un lapso de tiempo de 15-120 minutos. Este tratamiento selecciona simultáneamente las esporas de bacterias acidogénicas que germinan, produciendo H<sub>2</sub> cuando las condiciones son favorables para el crecimiento. La transición de las esporas inactivas a formas vegetativas activas se puede dividir en tres fases: la activación, la germinación y el crecimiento (figura 1.4). De esta manera es posible decir que el tratamiento térmico es adecuado para eliminar las células vegetativas y activar las esporas presentes en el inóculo. Las esporas son metabólicamente inactivas, resistentes al calor, radiación, deshidratación, pH extremos y agentes químicos (Setlow, 2003).

Adicionalmente, el costo-beneficio del tratamiento térmico y el predominio de las especies sensibles por clostridios en inóculos con tratamiento térmico convierten este enfoque de investigación en un tema controvertido y necesario para futuras investigaciones (Hong y Haiyun, 2010; Lee *et al.*, 2008). El enriquecimiento del inóculo con pretratamiento térmico consume energía. La energía requerida para este procedimiento puede ser economizada utilizando el exceso de calor en algún proceso acoplado. Esto puede resultar ser menos intensivo en energía si se lleva a cabo a temperaturas inferiores; es decir, en rango mesofílico (Li *et al.*, 2008b; Shin y Young, 2005; Kim *et al.*, 2011a).

Se han reportado en la literatura varios pretratamientos para el mejoramiento del inóculo productor de hidrógeno. Una amplia de fuentes naturales como lodos activados (Cohen *et al.*, 1985), suelo (Oh *et al.*, 2004), estiércol de vaca (Vijayaraghavan *et al.*, 2006a) y sedimentos de los ríos (Zuo *et al.*, 2005) se han utilizado como inóculos para la producción de hidrógeno. El proceso a temperatura de ebullición es el más frecuentemente reportado como método mejorador. En todos estos estudios se han empleado una variedad de sustratos (glucosa, RSO, vinazas, aguas residuales, etc.), diversos inóculos (lodos

anaerobios, suelo, sedimentos, etc.) y diferentes condiciones de operación (incluyendo varios rangos de temperatura, TRH, pH, etc.) (Kim *et al.*, 2010).



**Figura 1.4** La transición de las esporas inactivas a las formas vegetativas activas. Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo (2009)

La variabilidad natural de los cultivos de bacterias, aunado a los complejos mecanismos biológicos de producción de hidrógeno y las temperaturas de los pretratamientos térmicos (las cuales pueden afectar significativamente a la comunidad microbiana), no facilitan la comparación entre los diferentes estudios. (Li y Fang, 2007). La tabla 1.5 muestra las condiciones de pretratamientos aplicados a diferentes inóculos.

**Tabla 1.5** Tratamientos térmicos aplicados a diversos inóculos

Tratamiento	Tipo de inóculo	Referencia
100 °C, 15 min	Lodo anaerobio digerido	Lay <i>et al.</i> , 1999; Okamoto <i>et al.</i> , 2000; Lay, 2000
100 °C, 15 min	Harina de soya	Noike y Mizuno, 2000
104 °C, 2 h	Composta y suelo	van Ginkel <i>et al.</i> , (2001)
104 °C, 2 h	Suelo	Logan <i>et al.</i> , (2002)
75 °C, 1 h	Lodos de PTAR	Chang <i>et al.</i> , (2002)
121 °C, 30 min	Residuos sólidos	Wang <i>et al.</i> , (2003)
100 °C, 15 min	Mezcla de suelos profundos, excretas vacunas y porcinas	Alzate-Gaviria <i>et al.</i> , (2007)
90 °C, 10 min	Lodo anaerobio	Kim <i>et al.</i> , (2004)

PTAR Lodos de planta de tratamiento de aguas residuales

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Factores que afectan la producción biológica de H<sub>2</sub> a partir de los residuos sólidos orgánicos

#### 2.1.1 pH

El pH afecta no sólo a los rendimientos de producción de hidrógeno en cultivos mixtos, sino que también puede modificar la generación de subproductos que impactan sobre la estructura de las comunidades microbianas (Ye *et al.*, 2007; van Ginkel *et al.*, 2001 y Temudo *et al.*, 2007). La producción de hidrógeno óptima parece tener lugar con un pH entre 5.0 - 6.0 para los residuos de alimentos (Kim *et al.*, 2004 y 2006; Doi *et al.*, 2009). Además, el patrón de producción de AGVs es diferente en condiciones de pH variables. Butirato y acetato son los dos productos principales, a valores de pH bajos el acetato se produce preferentemente (Guo *et al.*, 2010; Rechtenbach *et al.*, 2008). La producción de hidrógeno vía acetato-butirato se ve favorecida a pH 4.5 - 6.0, mientras que en condiciones de pH neutro o superior, existe evidencia de acumulación de etanol y propionato (Hawkes *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2004, Pakarinen *et al.*, 2008 y Yokoyama *et al.*, 2007).

La selección del pH inicial es crucial para mejorar la producción del biogás, debido a los efectos en la actividad hidrogenasa o en vías metabólicas. Fan *et al.*, (2004) y van Ginkel *et al.*, (2001) han reportado que el máximo rendimiento de H<sub>2</sub> se determinó a un valor de pH de 5.5. Mientras, Lee *et al.*, (2002), reportó que el máximo rendimiento de producción de H<sub>2</sub> se logró a un pH inicial de 9.0. Dávila-Vazquez *et al.*, (2008) y Ramos *et al.*, (2012) encontraron que el máximo rendimiento de producción se produce bajo condiciones de cultivo a un pH inicial de 7.0.

Estos resultados contradictorios parecen ser debido a una falta de capacidad amortiguadora capaz de evitar una disminución del pH. Desde un punto de vista práctico, es importante investigar cómo el pH inicial influye en la producción de hidrógeno cuando no se aplica ningún tipo de control durante la fermentación.

## 2.1.2 Temperatura

A menudo la temperatura se considera como uno de los parámetros más importantes que afectan tanto los rendimientos de producción de H<sub>2</sub> y el metabolismo microbiano en cultivos mixtos (Li y Fang, 2007). La mayoría de los estudios sobre la producción fermentativa de hidrógeno se han basado en temperaturas mesófilas. Los residuos de cultivos suelen presentar un mayor rendimiento a temperaturas termófilas debido a una mejor hidrólisis de los compuestos lignocelulósicos.

No obstante, en cuanto a los residuos de alimentos, las temperaturas termofílicas parecen más adecuadas a pesar de las observaciones significativamente diferentes descritas en la literatura. Estas diferencias pueden deberse al origen del inóculo, la cantidad de compuestos fácilmente biodegradables y las condiciones de operación. A 55 °C el subproducto dominante generado es acetato mientras que a 20 °C se ve favorecido el proceso de producción de propionato (Karlsson *et al.*, 2008). En cualquier caso, la principal desventaja del proceso de fermentación anaerobia termófila es el requisito de energía para el calentamiento y mantenimiento. La tabla 2.1 resume diversos estudios que investigan el efecto de la temperatura en la producción fermentativa de hidrógeno

**Tabla 2.1** Estimación de los rendimientos de producción de H<sub>2</sub> en reactores anaerobios sobre el tratamiento de residuos de alimento como sustrato

Rendimiento de la producción máxima (mL H <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> sv)	Pretratamiento	Temperatura de operación (°C)	Modo de operación del reactor	Referencia
196	160 °C, 2 h	36	Batch	Li <i>et al.</i> , (2008)
60 <sup>a</sup>	ND	35	Batch	Kim <i>et al.</i> , (2004)
77	-----	35	Batch	Lay <i>et al.</i> , (2005)
125 <sup>a</sup>	-----	35	CSTR	Shin y Youn (2005)
63	pH 12.5, 1 día	35	ASBR	Kim y Shin (2008)
13	-----	20	CSTR	Karlsson <i>et al.</i> , (2008)
3	-----	37	CSTR	Karlsson <i>et al.</i> , (2008)
16.5	-----	55	CSTR	Karlsson <i>et al.</i> , (2008)

Sustrato: residuos de alimento (en todos los casos)

----- Ningún pretratamiento sobre el sustrato

ND, no realizada, no determinado

<sup>a</sup> Calculado a partir de datos de la literatura

En este orden, han existido diversos estudios reportando los efectos de la temperatura para la producción de H<sub>2</sub> por cultivos mixtos, los resultados difieren considerablemente. Por

ejemplo, Lee *et al.*, 2006 reportó que la mejor temperatura es de 40° C, mientras que Valdez-Vazquez *et al.*, 2005, mencionó que la óptima es de 55° C. La posible razón de que estos resultados difieran puede deberse a diferencias entre el sustrato, las concentraciones empleadas, el tipo de reactor y el inóculo empleado.

### **2.1.3 Tamaño de la partícula**

Se ha informado que partículas pequeñas (<0.5 mm) aumentan el área superficial disponible para los microorganismos, lo que genera un incremento en la población bacteriana debido a la disponibilidad de sustrato, por lo que el proceso de biodegradabilidad anaerobia es más eficiente. Moreno-Andrade y Buitrón (2011) reportan que es posible observar para bajas concentraciones de ST iniciales (5-15 g/L) un incremento en la producción de H<sub>2</sub> empleando RSO con un tamaño de partícula menor a 0.5 mm. Sin embargo, valores superiores a 20 g ST iniciales/L generan inhibición debido a la alta producción de ácidos grasos volátiles. Un tamaño de partícula más grande requiere mayor tiempo para producir la misma cantidad de H<sub>2</sub>. Cuando la concentración de ST iniciales se sitúa entre 5 a 20 g/L la mejor opción es emplear el tamaño de partícula menor a 0.5 mm debido a que la tasa de producción es mayor. En el caso de 15 g ST/L la tasa de producción de H<sub>2</sub> resultantes fueron  $0.068 \pm 0.008$ ,  $0.078 \pm 0.008$  y  $0.192 \pm 0.009$  mmol de H<sub>2</sub>/gTS/d para los RSO con tamaños de más de 2 mm, entre 0.5 y 2 mm y menor a 0.5 mm respectivamente (Moreno-Andrade y Buitrón, 2011). Este resultado está relacionado a la solubilidad variable de la materia orgánica reportado también por Izumi *et al.* (2010).

### **2.1.4 Concentración de sólidos iniciales**

La concentración de sólidos totales iniciales sobre la producción de H<sub>2</sub> a partir de los RSO ha demostrado influir sobre el porcentaje y volumen de generación de hidrógeno (Ramos *et al.*, 2012). La producción de H<sub>2</sub> a partir de los RSO condicionada por la concentración inicial de ST. La máxima tasa de producción (2.90 mmolH<sub>2</sub>/d) se obtuvo a 90 g ST/L a un pH de 5.5. A esta condición, los ST iniciales y la remoción de DQO se reportaron inferiores (10% de ST y 14% de DQO). Sin embargo, cuando los valores específicos se calcularon considerando la remoción de sólidos, la tasa máxima de degradación de 192.2 mL H<sub>2</sub>/gSV<sub>rem</sub>/d se obtuvieron a la concentración menor de ST probada y un pH inicial de 7.0.

La concentración de ST iniciales afecta la producción de H<sub>2</sub> en diferentes maneras (Maintinguer *et al.*, 2008). Una alta concentración de ST puede ser limitante para la transferencia de masa entre el sustrato y microorganismos reductores de producción de hidrógeno. Adicionalmente, la concentración inicial de sustrato puede resultar inhibitoria para las bacterias productoras de H<sub>2</sub> debido al incremento en la producción de los AGVs. Se ha observado que la producción de H<sub>2</sub> a partir de los RSO en un rango de temperaturas mesofílicas (34–37° C) es influenciado por el pH inicial, los sólidos suspendidos iniciales y las características del inóculo (Gómez *et al.*, 2009; Fountoulakis y Manios, 2009; Shi *et al.*, 2009, Liu *et al.*, 2006).

### 2.1.5 Presión parcial de hidrógeno (PpH<sub>2</sub>)

Diversos estudios han informado que la PpH<sub>2</sub> es un factor limitante en el curso de la fermentación de residuos orgánicos. La oxidación de componentes complejos reducidos tales como ácidos grasos de cadena larga a AGVs; concomitantemente con la producción de hidrógeno, es la consecuencia de una baja concentración de hidrógeno en el medio ya que las reacciones son termodinámicamente desfavorables (Li, 2009). La formación adicional de hidrógeno puede ser derivada de la degradación de acetato (ecuación 2.1).



Esta conversión es termodinámicamente desfavorable a temperaturas moderadas y la reacción es; por lo tanto, extremadamente sensible a la concentración de hidrógeno. Además, la reacción inversa, llamada homoacetogénesis, es más bien favorecida en el proceso de fermentación y en parte se reduce el rendimiento del reactor a través de la acumulación de acetato en el medio. Por el aumento de la concentración de hidrógeno en el medio debido al metabolismo microbiano, no sólo la producción de este puede verse afectada sino también se ha observado un cambio en las vías metabólicas hacia solventogénesis; es decir, la acumulación de lactato, etanol, acetona y butanol (Levin *et al.*, 2004). Investigaciones recientes indican; sin embargo, que el factor principal que conduce a solventogénesis es la acumulación de ácidos grasos volátiles en lugar de la presión parcial



de hidrógeno (Valdez-Vazquez *et al.*, 2006). Es por ello que es necesario mantener bajas  $P_{pH_2}$ .

Para disminuir  $P_{pH_2}$  en el medio, especialmente en bioprocesos altamente concentrados en el tratamiento de residuos orgánicos, la agitación es la técnica más usual (Chou *et al.*, 2008). Otra opción es la inyección de un gas inerte para remover el  $H_2$  producido; es una alternativa viable, en la cual se emplea nitrógeno gaseoso (Karlsson *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2006; Kim y Shin, 2008; Levin *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006; Mizuno *et al.*, 2000). La desventaja de este método es la obtención de una corriente gaseosa muy diluida, lo cual es costoso para llevar a cabo a escala industrial, debido al requerimiento de una etapa posterior de purificación y concentración. Con el fin de solucionar este problema se ha propuesto realizar la inyección del gas en forma intermitente (Valdez-Vazquez *et al.*, 2006; 2005).

#### **2.1.6 Concentración de Ácidos Grasos Volátiles (AGVs)**

También se ha observado que la concentración de los ácidos grasos volátiles (AGVs) es uno de los parámetros más importantes en el metabolismo anaerobio. Es bien sabido el efecto tóxico de altas concentraciones de AGVs en el proceso de digestión, debido al descenso de pH. Se ha analizado el rol del ácido propiónico en el proceso de las reacciones anaerobias. El metabolismo del ácido propiónico es el más sensible a la presión parcial de  $H_2$  ( $P_{pH_2}$ ) que debe ser inferior a  $9 \times 10^{-5}$  Atm (9.2 Pascal) para permitir su degradación. Por lo tanto, está claro que cuando el  $H_2$  se acumula (que es un resultado frecuente de una alteración del digester) el ácido propiónico tiende a formarse más rápidamente y más lenta se vuelve su degradación.

El proceso para producción de  $H_2$  a partir de los RSO se puede llevar a cabo mediante sistemas discontinuos (por lotes) o continuo. En el caso de los procesos discontinuos es necesario almacenar el residuo en un recipiente cerrado, el cual puede contener el inóculo de una digestión previa (como en el caso de los SBR) y durante el proceso puede haber recirculación de la mezcla. Esta modalidad de operación del reactor es adecuada cuando la disponibilidad del sustrato no es continua, como en el caso de la producción de RSO en

restaurantes, casas, etc. Una vez terminada la digestión, el material digerido se descarga y se inicia un nuevo lote. Este es un proceso simple y de bajo costo y disminuye el riesgo de toxicidad por AGVs al proceso.

## 2.2 Reactor anaerobio discontinuo por lotes (SBR)

Los reactores SBR son simples y útiles porque se pueden llevar a cabo la digestión rápida con equipo sencillo y de bajo costo (Parawira *et al.*, 2004; Weiland, 2006). Operan bajo cinco etapas bien definidas, tal como lo muestra la figura 2.1. Por otro lado, los reactores SBR presentan algunas limitaciones tales como las altas fluctuaciones en la producción de biogás así como la calidad del mismo, las pérdidas de biogás durante el vaciado de los biorreactores y alturas biorreactor restringidas (Linke *et al.*, 2006).

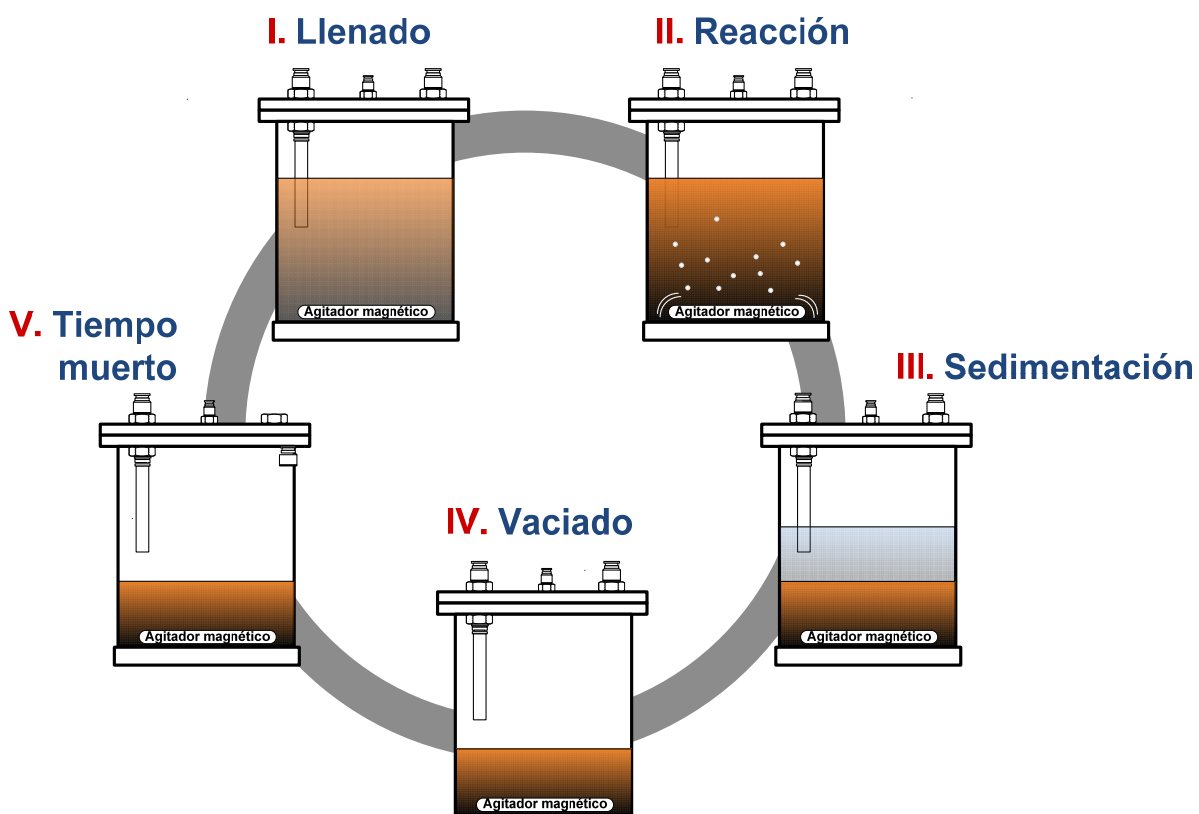


Figura 2.1 Fases típicas de operación de un SBR

Se conocen diferentes configuraciones de reactores que han sido empleados para tratar residuos de alimentos, la mayoría de ellos consisten en botellas serológicas -pequeña escala- (100-500) mL y fermentadores agitados de 2-10 L, operados bajo condiciones discontinuas, semicontinuas o continuas. En cuanto a la producción fermentativa de H<sub>2</sub>, el tiempo de retención de sólidos (TRS) y, a su vez, la TCO (tasa de carga orgánica) afectan la eficiencia de conversión del sustrato, la población activa de microorganismos presentes así como la vía metabólica establecida en el sistema. La influencia del TRS y la TCO en el rendimiento de H<sub>2</sub> es objeto de controversia en la literatura. En general se reconoce que largos tiempos de retención de sólidos favorecen la acumulación de los consumidores H<sub>2</sub>, como metanógenos y competidores de sustrato (Wang y Zhao, 2009).

La mayoría de los estudios que utilizaron reactores agitados con la operación continua o semi-continua, adoptaron valores de operación de TRH (tiempo de residencia hidráulica) entre 21 h (Lee y Chung, 2010, quien trabajó en la fase líquida extraída de residuos de alimentos) y 4 d (Lee *et al.*, 2010). Un reactor anaerobio de lotes (SBR) fue utilizado por Kim *et al.*, (2008) para la fermentación de residuos de alimentos, trabajando en diferentes TRS y TRH, el rendimiento máximo de hidrógeno (H<sub>2</sub> 809 mL/gVS, o 1.12 mol H<sub>2</sub>/mol hexosa) fue exhibido para un TRS de 126 h y un TRH de 33 h.

A los biorreactores anaerobios de residuos sólidos se les ha clasificado como “húmedos” o “secos”. De acuerdo con Ward *et al.* (2008), aquellos biorreactores húmedos operan con concentración de sólidos totales del 16% o menos, mientras que biorreactores secos contienen 22-40% de sólidos totales. Según Karagiannidis y Perkoulidis (2009), los sistemas secos deben contener 30-40% de materia seca en tanto que los sistemas húmedos contienen materia seca en un 10-25%. Otros tipos de biorreactores basado en diferentes rangos de temperaturas de operación (por ejemplo, termófilo o mesófilo) también están disponibles para la digestión de residuos sólidos (Kuo y Cheng, 2007; Karagiannidis y Perkoulidis, 2009).

Las diferentes versiones de los SBR incluyen influentes continuos y/o periódicos y distintas fases de reacción, sedimentación y vaciado (Wilderer *et al.*, 2001). El proceso SBR puede

trabajar con biomasa suspendida, fija o una mezcla de ambos. Normalmente operan bajo cinco fases bien definidas que son: llenado, reacción, sedimentación, vaciado y tiempo muerto, en la tabla 2.2 se puede revisar la descripción de cada una de sus etapas.

En este trabajo se plantea el uso de un reactor SBR ya que se ha reportado que una de las ventajas de estos sistemas por lotes, es que se puede adaptar fácilmente a las variaciones continuas de concentraciones de contaminantes (Irvine *et al.*, 1997). De hecho, los balances de masa de los sistemas de lotes describen el comportamiento inestable producido por las variaciones naturales de los flujos volumétricos y las concentraciones de contaminantes (Irvine y Ketchum, 1998).

**Tabla 2.2** Descripción operacional del SBR

Fase operacional	Descripción
1. Llenado	Durante la operación de llenado, el volumen y sustrato son adicionados al reactor. Dependiendo del objetivo del proceso ésta fase puede subdividirse en: 1) llenado estático (no existe agitación, permitiendo la acumulación de sustrato), 2) llenado con mezclado (no existe suministro de aire por lo cual existe en mínima cantidad, permitiendo la posibilidad de obtener ambientes anóxicos o anaerobios en el reactor) y 3) llenado con aireación (mezclado con aire, lo cual deriva en reacciones aerobias durante el llenado, lo cual no será empleado en este estudio).
2. Reacción	En éste periodo, la biomasa consume al sustrato bajo condiciones ambientales controladas. Puede existir agitación.
3. Sedimentación	La fase sólida se separa de la líquida bajo condiciones de inactividad, resultando en un sobrenadante clarificado que puede ser descargado como efluente.
4. Vaciado	El efluente clarificado es retirado durante éste periodo.
5. Tiempo muerto	Durante este paso se utiliza un sistema multitanque para proveer el tiempo necesario a un reactor para completar su fase de llenado antes de cambiarse a otra unidad. Esta fase no es necesaria, algunas veces se omite.

(Metcalf & Eddy, 2003)

# III. METODOLOGÍA

## 3.1 Plan experimental

El presente estudio se dividió en tres etapas (figura 3.1).

- I. Caracterización de los residuos sólidos orgánicos obtenidos de una cafetería.
- II. Pretratamiento del inóculo. Se empleó como inóculo lodo granular obtenido de un reactor anaerobio que degrada aguas residuales de la industria cervecera. Se efectuaron tres pretratamientos distintos sobre el inóculo a fin de inhibir la producción de metano en el arranque y operación del reactor.
  - [1] Inhibidor químico no selectivo (Cloroformo,  $\text{CHCl}_3$ )
  - [2] Inhibidor químico selectivo (Lumazina, [2, 4-(1H, 3H)-pteridinediona])
  - [3] Exposición del inóculo a un tratamiento térmico a 103-105 °C durante 1 h
- III. Diseño, arranque y operación de un biorreactor SBR, a condiciones constantes de temperatura, pH, agitación, sólidos totales iniciales, excepto el tiempo de retención hidráulica (TRH) el cual se evaluó en 72, 24, 12 y 6 horas para determinar las cinéticas de producción de  $\text{H}_2$  y producción de AGVs.

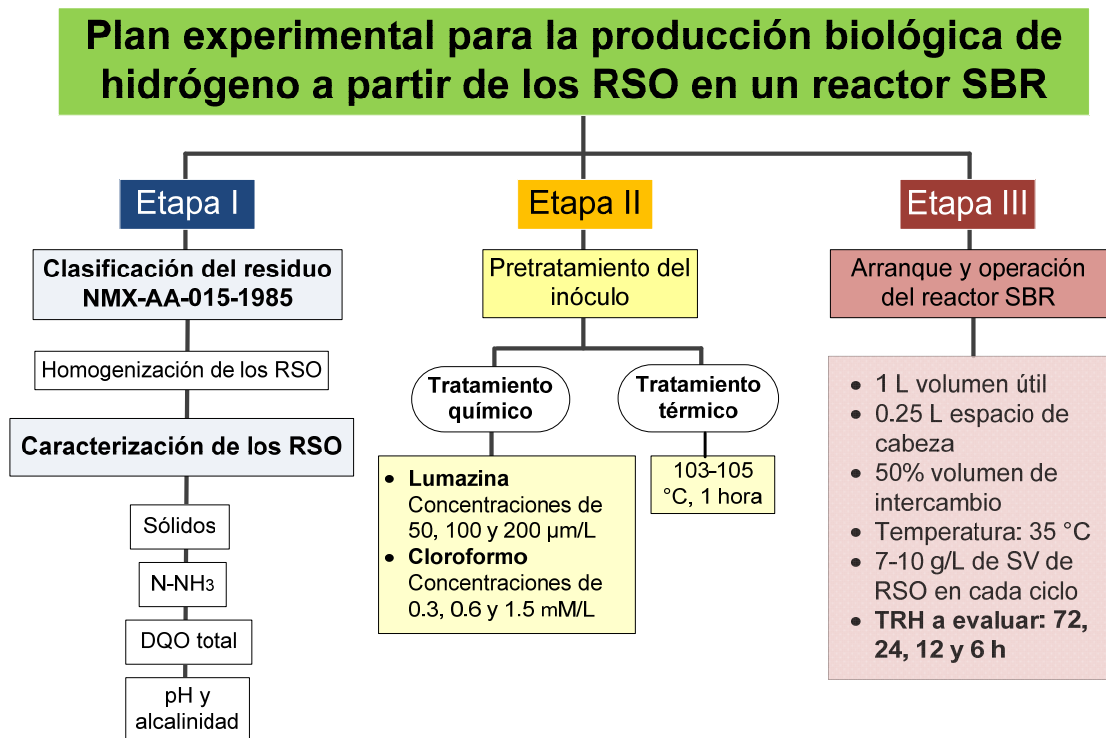


Figura 3.1 Estrategia experimental seguida

Las pruebas de la etapa I y II fueron realizadas por duplicado para la obtención de medias y desviación estándar. El reactor SBR (etapa III) se operó durante 62 ciclos de los cuales, el tiempo de retención hidráulica inicial se estableció en 72 h (ciclos evaluados del 1 al 9), una vez que se estabilizó el proceso se procedió a disminuir el tiempo de retención hidráulica a 24 h (ciclos 10-20), después a 12 h (ciclos 21-43) y finalmente a 6h (ciclos 44-59).

### **3.2 Etapa I. Caracterización de los RSO**

Los RSO se obtuvieron de la cafetería del campus Juriquilla, UNAM. Para la finalidad de este proyecto se descartó el material inerte (latas o contenedores de metal y plástico, papel, cartón y huesos) y se utilizaron únicamente los residuos de alimento. Para la cuantificación de los residuos obtenidos en la cafetería se procedió de acuerdo a lo que se establece en la NMX-AA-015-1985 (método de cuarteo). Se efectuaron tres tomas de muestras de RSO (cada una de ellas de 3 kg) por un periodo de tres semanas y posteriormente se trituraron y homogenizaron con ayuda de una licuadora hasta que se obtuvo un tamaño de partícula inferior a 0.5 mm, empleando para ello un tamiz de acero inoxidable (medida estándar 0.500 mm, malla 32).

El residuo mezclado y homogenizado se caracterizó (determinación de DQO total, N-NH<sub>3</sub>, ST, SV, SF y alcalinidad) de acuerdo a la metodología estándar (APHA, 2005) y posteriormente se preservó en bolsas de cierre hermético marca Ziploc® en un congelador a -20 °C hasta su uso.

### **3.3 Etapa II. Pretratamientos del inóculo**

En esta fase se determinaron las diferencias de producción de H<sub>2</sub> debido a los pretratamientos que se aplicaron al inóculo obtenido de un reactor anaerobio que degrada aguas residuales de la industria cervecera. En la tabla 1.3 se observaban las condiciones evaluadas por cada pretratamiento aplicado al inóculo. Los RSO adquiridos de la cafetería UNAM-campus Juriquilla, se emplearon como sustrato en esta etapa. El objetivo de esta evaluación fue determinar cuál de los tres pretratamientos valorados fue superior en cuanto

a la producción de H<sub>2</sub> ya que de ello dependió su selección para la última etapa de este proyecto, la inoculación para la operación del biorreactor SBR.

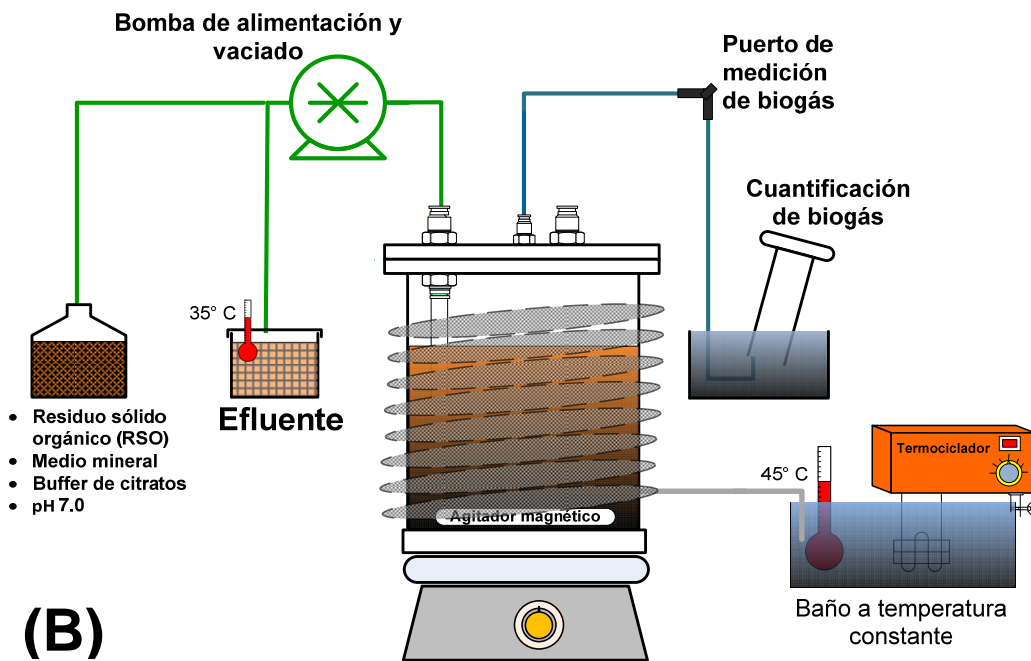
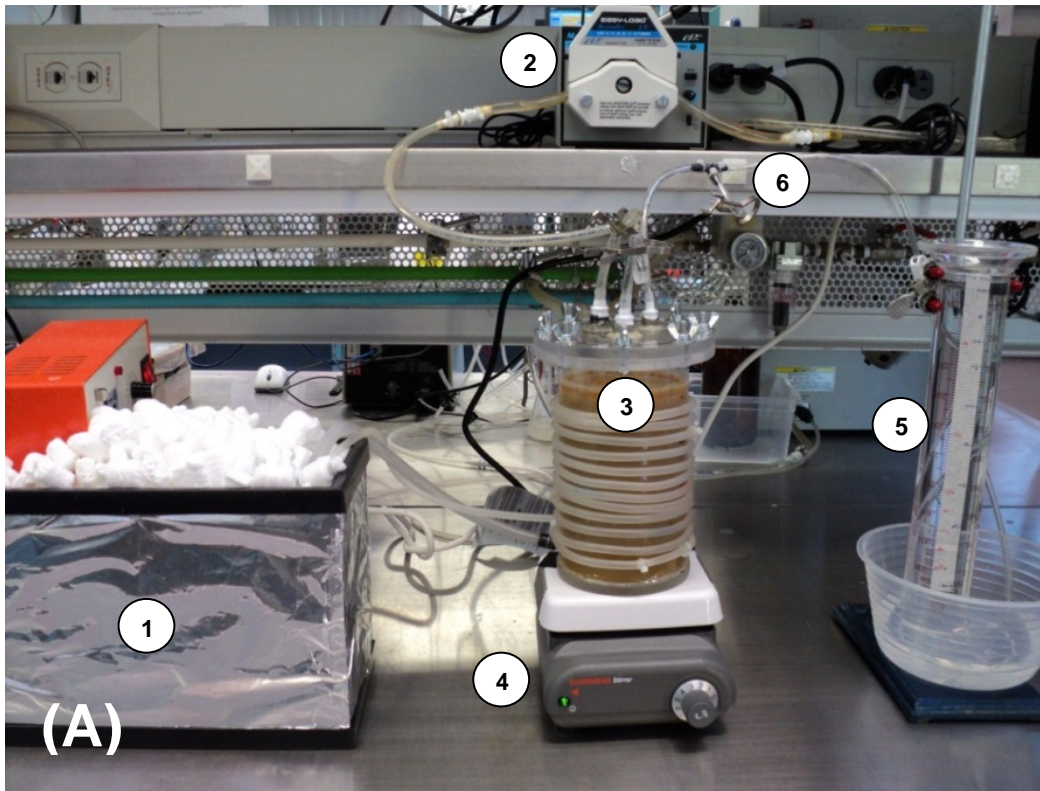
**Tabla 3.1** Pretratamientos del inóculo evaluados

Pretratamiento	Concentración evaluada	Referencia
1. Inhibidor químico no específico (Cloroformo)	50, 100 y 200 µL/L	Oremland y Capone (1998); Schulz y Conrad (1996); DeGraaf <i>et al.</i> , (1996)
2. Inhibidor químico específico (Lumazina)	0.3, 0.6 y 1.5 mM/L	Nagar-Anthal <i>et al.</i> , (1996)
3. Choque térmico	1 hora, 103-105 °C	Lay <i>et al.</i> , (2003)

Cada prueba se realizó en reactores batch (frascos serológicos en lote de 80 mL de volumen útil de reacción, volumen total de 120 mL). Se agregaron 3 g de inóculo (equivalente a 12.5 g/L ST) y 3 g de RSO (como sustrato) equivalente a 36.36 g/L de ST para cada evaluación. Se añadió medio mineral (Mizuno *et al.*, 2000), además de un buffer de citratos 1M (2.5 mL) a cada frasco serológico para evitar la acidificación del medio. A su vez, la temperatura y agitación de operación se mantuvo a 36 °C mediante una incubadora y agitador orbital marca GYROMAX 747 R a 160 rpm. Se midió, a intervalos regulares de tiempo, la presión del biogás generado en cada frasco con ayuda de un transductor de presión electrónico modelo PS100 (2 Bar). Al obtener una producción constante de biogás (al inicio y durante la prueba), se determinó la composición del mismo (H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>) por medio de cromatografía de gases (VARIAN SRI 8610 C) y la producción total de hidrógeno. La operación se mantuvo por un periodo de 250 horas. Al inicio y final del ciclo se determinó la remoción de la materia orgánica expresada como DQO (total), pH, sólidos totales, volátiles y fijos (APHA, 2005) y la producción de ácidos grasos volátiles (AGVs) por medio de cromatografía de gases (Agilen Tech 6890N, VARIAN 330 C). El pretratamiento con mejores resultados se empleó en el arranque del biorreactor de 1.25 L.

### 3.4 Etapa III. Diseño, arranque y operación de un biorreactor

El reactor empleado se fabricó en material acrílico, con un volumen total de 1.25 L, incluyendo 0.25 L de espacio libre de cabeza (figura 3.3). Éste se operó bajo un volumen de intercambio del 50% en cada ciclo. Las etapas de alimentación y vaciado (15 min para ambas actividades) se efectuaron con asistencia de bombas marca Masterflex.



**Figura 3.2 (A).** Fotografía de la estrategia experimental: (1) baño a temperatura de 45°C para mantener dentro del reactor una temperatura controlada de  $35 \pm 2$  °C, (2) bomba peristáltica de alimentación y vaciado, (3) reactor SBR de 1.25 L, (4) parrilla de agitación magnética, (5) probeta invertida para la cuantificación de biogás y (6) puerto de medición de biogás. **(B).** Diagrama del reactor SBR empleado en la producción biológica de H<sub>2</sub> a partir de los RSO de una cafetería



La agitación del reactor se mantuvo constante con asistencia de una parrilla de agitación magnética marca CORNING a 150 rpm. La temperatura del reactor se conservó en 35°C por medio de serpentín que recircula el agua mediante un termostato. La cuantificación del biogás se realizó por medio del desplazamiento de un líquido (agua), con probeta invertida y la caracterización por medio de cromatografía de gases (VARIAN SRI 8610 C). Al reactor se le añadieron 16 g del inóculo; lodo pretratado térmicamente (equivalente a 66 g/L de ST) únicamente al inicio de la operación, cantidad que prevaleció durante todos los ciclos evaluados.

Para evaluar la producción de H<sub>2</sub> en respuesta de los distintos TRH valorados se llevó a cabo un análisis cinético empleando y ajustando al modelo de Gompertz (ecuación 1.7). El pH se ajustó al inicio de cada alimentación con RSO a un valor de 7.0. Se añadió un buffer de citratos (1M) para evitar la acidificación del medio debido a la presencia de AGVs.

Adicionalmente se agregó una solución mineral (Mizuno *et al.*, 2000) constituida por las soluciones preparadas por separado para evitar su precipitación o reacción (tabla 3.2). Para la preparación de este medio mineral se agregaron 25 mL de la solución I y III y 5 mL de la solución II. Los ST iniciales alimentados al reactor fueron 7-10 g/L de RSO en cada ciclo.

**Tabla 3.2** Medio mineral definido

Solución I	Cantidad L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
Solución II	
NH <sub>4</sub> Cl	52 g
MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	0.05 g
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	2.5 g
Solución III	
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.5 g
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0.25 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.05 g
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0.05 g
NiCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0.05 g
ZnCl <sub>2</sub>	0.05 g

En la alimentación y efluente del reactor se midieron los siguientes parámetros: demanda química de oxígeno (DQO), sólidos totales, fijos y volátiles (ST, SF y SV), nitrógeno

amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) y alcalinidad mediante técnicas analíticas estándar (APHA 2005). Al obtener una producción de biogás constante, se determinó la composición del mismo (H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>) por medio de cromatografía de gases (SRI 8610 C). Para determinar la fracción mol de H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> en el biogás producido, se toman 10 mL de biogás con ayuda de una jeringa y se analizarán en el cromatógrafo de gases (SRI 8610C) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) y dos columnas en paralelo (6' MS-13x y 6' Silica-Gel). La temperatura de operación de la celda TCD y el inyector serán 150 °C y 90 °C, respectivamente. Como gas acarreador se empleará N<sub>2</sub> con un flujo de 20 mL/min.

Al final de cada ciclo se determinó el pH final, la remoción de la concentración de DQO total, sólidos totales, sólidos volátiles de acuerdo a las técnicas estándar (APHA, 2005).

La producción de ácidos grasos volátiles (ácido acético, propiónico y butírico), acetona y etanol también fueron determinadas por medio de cromatografía de gases (VARIAN 330 C). La evaluación de los AGVs y solventes permiten identificar los principales productos del consorcio microbiano del sistema y poder proponer las posibles rutas metabólicas para la producción de H<sub>2</sub>. Para este análisis, se toman 1.5 mL de muestra centrifugada 4000 rpm por 10 minutos y filtrada para colocarse en un tubo de 2.0 mL con una gota de HCl 2 N para su conservación. Una vez preparada la muestra se determinan las ppm de AGVs o solventes producidos durante los ciclos evaluados, para ello se emplea un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de la flama (FID) y una columna capilar Agilent 30m x 0.25 µm de fase estacionaria (HP 5 MS 5% fenil metil siloxano) en el cual se inyecta 0.2 µL de muestra para ser analizados con la técnica previamente establecida para el análisis del equipo. Los datos de área obtenidos se cotejarán con la curva de patrón realizada para cada reactivo y así determinar las ppm de AGVs y de solventes en la muestra.

## IV. RESULTADOS y DISCUSIÓN <sup>1</sup>

### 4.1 Etapa I. Caracterización de los RSO

El residuo de alimento empleado para este estudio; proveniente de la cafetería del campus Juriquilla (UNAM), se recolectó por espacio de tres semanas. Se procedió a su cuantificación y selección de acuerdo a la norma NMX-AA-015-1985, misma que fue modificada. Dichas modificaciones incluyeron el análisis de cuatro fracciones (frutas y verduras, carne, harinas -tortilla, pan y pasta- y una porción mixta) del subproducto indicado en la norma como residuo de alimento. Además, se realizaron correcciones en cuanto a las cantidades de sólidos obtenidos en el muestreo ya que la cantidad de residuos generados en la cafetería son menores a los mencionados en la norma.

Una vez clasificado el residuo se inició su mezcla (resultado de los tres muestreos de RSO, aproximadamente 9.0 kg totales), trituración y homogenización con la ayuda de una licuadora, para conseguir un tamaño de partícula de 0.5 mm de diámetro, logrado a través de un tamiz de acero inoxidable (medida estándar 0.500 mm, malla 32). Las muestras se mantuvieron congeladas a -20°C hasta su uso en bolsas de plástico con cierre hermético. Los resultados de la cuantificación de los RSO empleados en este estudio se muestran en la tabla 4.1.

---

#### <sup>1</sup> Publicaciones derivadas de la parte experimental de este trabajo

##### **Memorias congresos nacionales**

Bujanos-Adame MC, Moreno-Andrade I. (2012). Determinación del mejor pretratamiento del inóculo para la producción biológica de hidrógeno a partir de residuos. II Congreso de Alumnos de Posgrado, Coordinación de estudios de posgrado, UNAM. Presentación cartel. 2-4 de abril de 2012. México D.F.

Bujanos-Adame MC, Moreno-Andrade I. (2013). Producción de hidrógeno a partir de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos en un biorreactor discontinuo. III IWA México, 2013. Young Water Professionals. Presentación oral. Abril de 2013. San Luis Potosí, SLP, México

##### **Memorias congresos internacionales**

Bujanos-Adame MC, Moreno-Andrade I. (2013). Use of organic fraction of solid waste for hydrogen production in a sequencing batch reactor. XV National Congress of Biotechnology and Bioengineering. Oral presentation. June 23rd-28th. Cancún, Quintana Roo, México

Bujanos-Adame MC, Moreno-Andrade I. (2013). Bio-hydrogen production from the organic fraction of solid waste of a cafeteria in a discontinuous process. 13rd world congress on anaerobic digestion. Recovering (bio) resources for the world. Poster presentation. June 25-28, 2013. Santiago de Compostela, Spain

**Tabla 4.1** Selección y cuantificación de subproductos de los residuos sólidos orgánicos

Subproducto	Fracción	Muestra I (%)	Muestra II (%)	Muestra III (%)
Residuo de alimento	Frutas y verduras	74.28 ± 16.11	69.51 ± 16.11	44.3 ± 16.11
	Carne	10.66 ± 7.27	13.9 ± 7.27	-----
	Harinas	6.28 ± 8.02	13.23 ± 8.02	22.27 ± 8.02
	Mixto	8.76 ± 16.03	3.34 ± 16.03	33.41 ± 16.03

Adecuado de: Norma Mexicana NMX-AA-022-1985 Protección al Ambiente. Contaminación del Suelo. Residuos Sólidos Municipales. Selección y Cuantificación de Subproductos

Es importante señalar que los resultados indican una alta heterogeneidad en los muestreos efectuados respecto al contenido de las diferentes fracciones, razón por la cual se optó por mezclar los residuos obtenidos con la finalidad de generar una pasta con características homogéneas. Posterior al muestreo, mezclado y trituración de los RSO se realizaron los análisis correspondientes para su caracterización, los resultados se muestran en la tabla 4.2.

**Tabla 4.2** Caracterización de los residuos sólidos orgánicos empleados en este estudio

Parámetro	Valor
Humedad	82%
ST	206.05 (g/L)
SF	40.08 (g/L)
SV	165.97 (g/L)
Densidad	1115.5 (kg/m <sup>3</sup> )
DQO total	33.6 (g/L)
Alcalinidad	17.6 (g/L de CaCO <sub>3</sub> )

APHA (2005)

Como era de esperar, se registró un alto porcentaje de humedad ya que el residuo recolectado tenía un tiempo de vida no mayor a un día, este parámetro facilitó su homogenización con licuadora ya que los lixiviados de los residuos reblandecieron la operación. Las figura 4.1 y 4.2 muestran la apariencia de los RSO recolectados y homogenizados con ayuda de una licuadora. La clasificación por el método de cuarteo, generó un solo lote (stock, 9.0 kg) el cual fue empleado como alimento para el reactor a través de los diferentes ciclos.



**Figura 4.1** Residuos de alimento provenientes de la cafetería de la UNAM campus Juriquilla



**Figura 4.2** Residuos homogenizados almacenados en bolsas de plástico

## 4.2 Etapa II. Pretratamientos del inóculo

Se evaluó la efectividad de tres pretratamientos, dos inhibidores químicos (cloroformo y lumazina) y un pretratamiento térmico (103-105 °C, 1 h), sobre el inóculo (lodo granular anaerobio) para seleccionar entre ellos el que produjo mayor cantidad de  $\text{mmol H}_2 \text{ h}^{-1}$  y, en base a ello, emplear ese inóculo para el arranque del reactor SBR.

### 4.2.1 Pretratamiento con Cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ )

En este estudio se evaluaron concentraciones de este compuesto menores a 200  $\mu\text{M/L}$ . En la tabla 4.3 se pueden observar los valores obtenidos como resultado del tratamiento del inóculo a concentraciones de 50, 100 y 200  $\mu\text{M/L}$  de cloroformo, así como la producción de  $\text{H}_2$ . Los parámetros incluidos en esta tabla son importantes en la producción de biogás debido a que nos indican el comportamiento del sistema en cuanto a la producción de  $\text{H}_2$ .  $H_{max}$  representa la producción acumulada máxima de  $\text{H}_2$  (mL),  $R_{max}$  la tasa de producción máxima (o velocidad de producción) de  $\text{H}_2$  (mL/h) y  $\lambda$  indica la fase de latencia (h) requerida para comenzar la evolución del  $\text{H}_2$ . Los anteriores son parámetros ajustados al modelo de Gompertz (ecuación 1.7).

Existen importantes diferencias entre las fases de latencia ( $\lambda$ ) que se obtuvieron en el estudio de las distintas concentraciones de pretratamiento químico. A medida que ( $\lambda$ )

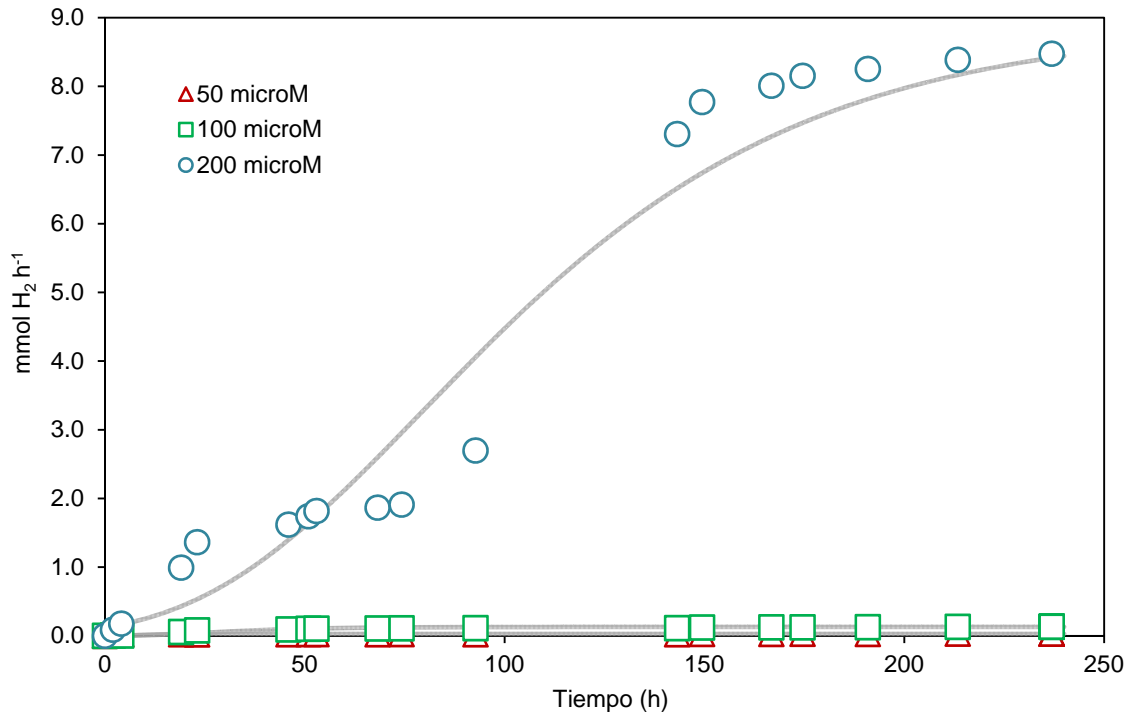
umenta respecto a la concentración aplicada, la producción de hidrógeno (PH) acompaña dicho fenómeno lo cual implica que mientras más tiempo de latencia sea necesaria para cada prueba, la PH se verá menos afectada.

**Tabla 4.3** Producción de biogás, efecto del pretratamiento con cloroformo sobre el inóculo

CHCl <sub>3</sub> (μM/L)	λ (h)	H <sub>max</sub> mLH <sub>2</sub>	R <sub>max</sub> mLH <sub>2</sub> /h	PH (mLH <sub>2</sub> /L <sub>reactor</sub> /h)	PEH (mLH <sub>2</sub> /gSV <sub>añadido</sub> )	Producción media de H <sub>2</sub> (mmol h <sup>-1</sup> )	Contenido de biogás (%)		
							H <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>
50	4	0.029	0.0025	0.0164	0.003	0.026	2.80	0.00	97.19
100	10	0.130	0.0030	0.0133	0.013	0.097	3.57	0.00	96.42
200	25	8.900	0.0600	0.9165	0.916	3.923	57.33	0.00	42.66

Asimismo, la producción específica de hidrógeno (PEH) se incrementa a pesar de poseer la misma cantidad añadida de SV de RSO. Esto puede deberse a que mientras mayor sea la concentración aplicada en el pretratamiento, el CHCl<sub>3</sub> inhibirá a los microorganismos incapaces de esporular (*archeas* metanogénicas) dando lugar a aquellas que germinan en cuanto se presenten las condiciones necesarias y sin la competencia de aquellos microorganismos consumidores de H<sub>2</sub> que ya fueron eliminados.

En cuanto a la producción de biogás en esta prueba, es evidente observar que el mayor porcentaje generado de H<sub>2</sub> fue de 57.33% en la concentración mayor de inhibidor aplicado (200 μM/L), además de reportarse nula producción de metano. Este hecho puede ser comprobado con la figura 4.3, que muestra las cinéticas de producción de H<sub>2</sub> ajustadas al modelo de Gompertz (ecuación 1.7) con 7.30 mmol h<sup>-1</sup> aproximadamente a las 150 h del transcurso de la prueba. Los valores promedio de producción de H<sub>2</sub> en mmol h<sup>-1</sup> para las tres concentraciones evaluadas fueron 0.026, 0.097 y 3.923, para 50, 100 y 200 μM/L, respectivamente (tabla 4.3).



**Figura 4.3** Producción de H<sub>2</sub> (mmol h<sup>-1</sup>) resultado del pretratamiento con cloroformo

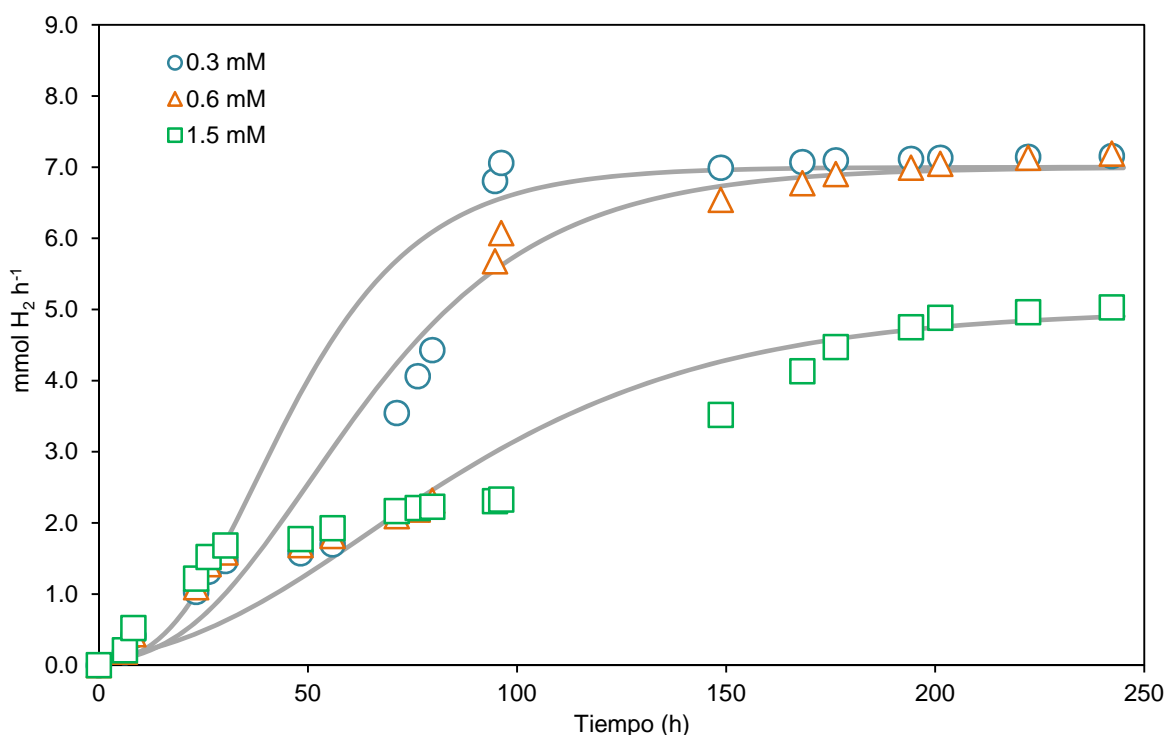
#### 4.2.2 Pretratamiento con Lumazina

En la tabla 4.2 se pueden observar los valores obtenidos como resultado del tratamiento del inóculo a concentraciones de 0.3, 0.6 y 1.5 mM/L de lumazina, así como la producción de H<sub>2</sub>. La concentración de SV añadidos permanece constante para todas las pruebas de estudio del pretratamiento al inóculo (9.7 g/L SV). En esta evaluación no se observan diferencias significativas en la fase de latencia ( $\lambda$ ) como se mostraron en la prueba anterior con cloroformo. Además, el contenido de biogás en esta evaluación resulta homogéneo en las concentraciones más bajas de lumazina (0.3 y 0.6 mM/L), no así para la aplicación mayor de 1.5 mM/L del inhibidor que produce 56.85% de H<sub>2</sub> en la composición del biogás (tabla 4.4), comparado con la producción generada con en las concentraciones de 0.3 y 0.6 mM/L evaluadas. Esta última concentración aplicada reporta un valor de producción de H<sub>2</sub> en el contenido de biogás similar a la evaluación con cloroformo.

**Tabla 4.4** Producción de biogás, efecto del pretratamiento con lumazina sobre el inóculo

Lumazina (Mm/L)	$\lambda$ (h)	$H_{max}$ mL $H_2$	$R_{max}$ mL $H_2$ /d	PH (mL $H_2$ /L $_{reactor}$ /h)	PEH (mL $H_2$ /gSV $_{añadido}$ )	Producción media de $H_2$ (mmol $h^{-1}$ )	Contenido de biogás (%)		
							$H_2$	$CH_4$	$CO_2$
0.3	16	7.0	0.120	2.326	0.7209	4.163	46.77	1.17	52.04
0.6	20	7.0	0.085	2.326	0.7209	3.756	49.67	0.00	50.32
1.5	18	5.0	0.040	1.661	0.5149	2.590	56.85	0.39	42.74

Es importante señalar que este hecho se observa para las concentraciones más altas de ambos inhibidores, además presentan cierta similitud en la fase de latencia ( $\lambda$ ), no así en la producción volumétrica de hidrógeno ( $H_{max}$ ) que resulta similar en este estudio a diferencia de la prueba anterior. En este caso, mientras menor concentración del inhibidor químico se aplique, mayor es la cantidad producida, 7.0 mL  $H_2$ . Este fenómeno también puede comprobarse con las cinéticas de producción ajustadas al modelo de Gompertz (ecuación 1.7) que se muestra en la figura 4.4.

**Figura 4.4** Producción de  $H_2$  ( $mmol\ h^{-1}$ ) resultado del pretratamiento con lumazina



Alrededor de las primeras 100 h del transcurso de la prueba la cantidad producida de H<sub>2</sub> asciende rápidamente hasta alcanzar 7.05 mmol h<sup>-1</sup> para después entrar en la fase estacionaria, esto con la concentración de 0.3 mM/L de lumazina. Seguida de esto, las concentraciones de 0.6 y 1.5 Mm/L produjeron 6.07 y 3.51 mmol H<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> aproximadamente a las 100 y 150 h, respectivamente.

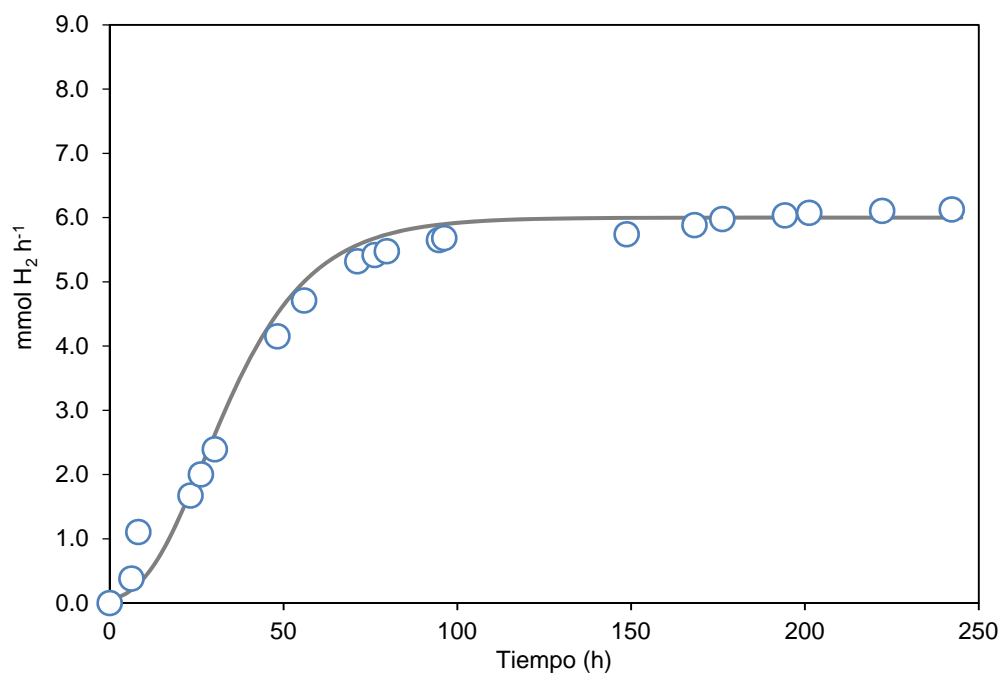
### 4.2.3 Pretratamiento térmico

El inóculo se expuso a una temperatura de 103-105° C por un periodo de 1 h, esto propició que se seleccionaran únicamente los microorganismos productores de hidrógeno. Lo anterior explica el porcentaje de H<sub>2</sub> obtenido en esta prueba (61.8 %) que resulta superior comparado con los pretratamientos con inhibidores químicos. Como se mencionó anteriormente, la desventaja de emplear inhibidores químicos produce opiniones controvertidas respecto al tema ambiental ya que su aplicación se realiza directamente sobre el inóculo y; una vez terminados los ciclos experimentales, este residuo genera problemas respecto a su disposición o eliminación.

Los valores obtenidos en la producción de H<sub>2</sub> y rendimiento de la prueba fueron 10 h ( $\lambda$ ), 6.0 mL H<sub>2</sub> (H<sub>max</sub>), 0.130 mL H<sub>2</sub>/h (R<sub>max</sub>), 1.993 mL H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>/h (PH), 0.6179 mL H<sub>2</sub>/gSV<sub>añadido</sub> (PEH) y 4.294 (mmol h<sup>-1</sup>). En cuanto a la producción de biogás obtenida, los resultados fueron los siguientes: 61.79, 0.00 y 38.20% de H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, respectivamente. Adicionalmente, la producción máxima de H<sub>2</sub> reportada durante esta evaluación fue de 5.65 mmol h<sup>-1</sup> aproximadamente a las 100 h en el transcurso del ciclo; antes de entrar en una fase estacionaria, fenómeno que resulta similar para las pruebas anteriores (figura 4.5).

Las diversas vías metabólicas que se pueden establecer; ya sea que se promuevan o inhiban, dependerá de las condiciones de operación adoptadas que gobiernan la producción de ácidos grasos volátiles (AGVs) y alcoholes. En la fermentación de carbohidratos, las vías de acetato y butirato implican la producción de 4 y 2 moles de H<sub>2</sub> por mol de glucosa degradada, respectivamente. Sin embargo, propionato, etanol y ácido láctico también se pueden producir en cultivos bacterianos mixtos que afectan adversamente la producción de H<sub>2</sub>. El propionato es un metabolito que consume H<sub>2</sub> (Guo *et al.*, 2010), por esta razón habrá

que vigilar el aumento en la producción de este intermediario y optar por un proceso para inhibir o detener dicha producción.



**Figura 4.5** Efecto del pretratamiento térmico sobre el inóculo para la producción de biogás

La producción de AGVs se muestra en la tabla 4.5. Es posible observar que, en todos los pretratamientos, existió una mayor producción de ácido acético y butírico en comparación con el propiónico. Sin embargo, la cantidad de ácido propiónico fue al menos tres veces superior en comparación con los otros pretratamientos, por lo que no se obtuvo una generación eficiente de hidrógeno.

**Tabla 4.5** Producción de AGVs en las pruebas del pretratamiento al inóculo

Tratamiento	Concentración	AGVs (g/L)				
		Acetona	Etanol	Acético	Propiónico	Butírico
Cloroformo ( $\mu$ M/L)	50	0.023	0.142	0.630	0.004	0.033
	100	0.000	0.000	0.006	0.020	0.100
	200	0.000	0.000	0.325	0.011	0.401
Lumazina (mM/L)	0.3	0.054	0.099	3.149	0.168	1.782
	0.6	0.135	0.262	2.734	0.217	1.101
	1.5	0.216	0.008	2.518	0.281	2.018
Térmico	105°C, 1h	0.097	0.037	0.944	0.076	1.514

### 4.3 Etapa III. Arranque y operación de un biorreactor

El reactor se operó durante 62 ciclos para determinar la estabilidad del proceso. El volumen de intercambio se mantuvo en un 50%. La temperatura se mantuvo en 35°C (régimen mesofílico) por medio de serpentín que recircula el agua mediante un termostato. Fueron añadidos 16 g del inóculo; lodo pretratado térmicamente, equivalente a 66 g/L de ST. Se empleó un tiempo de retención hidráulica inicial de 72 h (ciclos del 1 al 9). Una vez que el reactor operó de forma estable, se procedió a disminuir el TRH a 24 (ciclos 10-20), 12 (ciclos 21-43) y 6 h (ciclos 44-59). Para evaluar la producción de H<sub>2</sub> en respuesta de los distintos TRH valorados se llevó a cabo un análisis cinético empleando y ajustando a la ecuación de Gompertz (1.7).

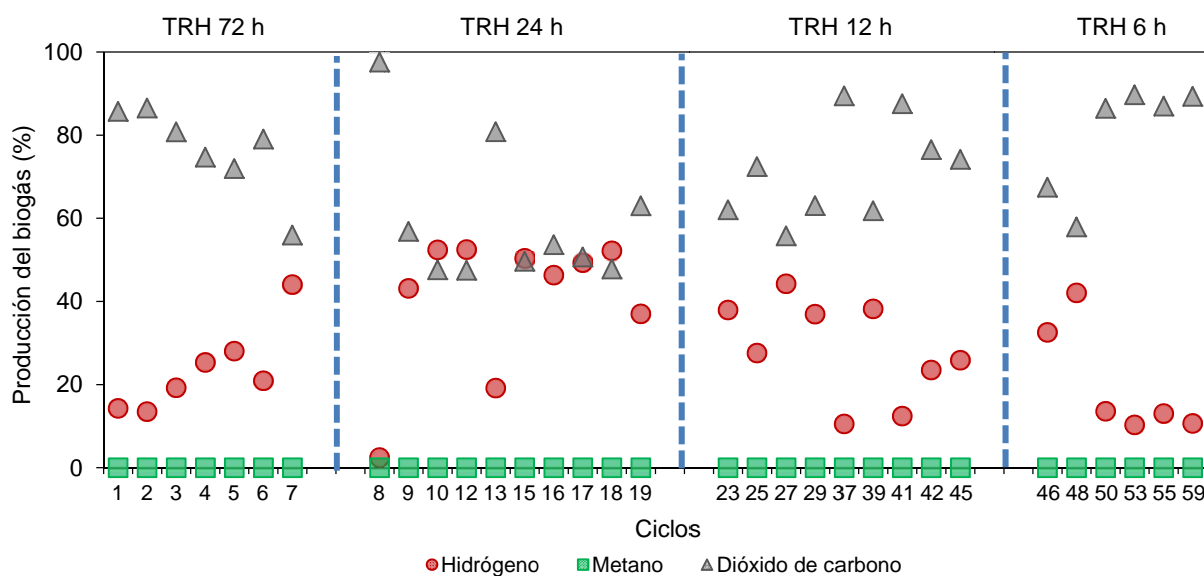
#### 4.3.1 Efecto del TRH en la composición del biogás

Como se observa en la tabla 4.6, sólo H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> están presentes en la composición de biogás a lo largo del experimento, no se detectó metano ni otros consumidores de H<sub>2</sub>, lo que indica que el pretratamiento térmico seleccionado en la segunda etapa de la metodología fue adecuado para evitar el crecimiento de microorganismos metanogénicos. Al reducir el TRH de 72 a 6 h, la producción de H<sub>2</sub> (PH) se incrementó gradualmente de 0.123 mLH<sub>2</sub>/mL<sub>reactor</sub>/d a un valor máximo de 1.13 mLH<sub>2</sub>/mL<sub>reactor</sub>/d. Esta relación inversa entre el TRH y la producción de hidrógeno en el reactor, ha sido corroborada por varios autores (Shin y Youn, 2005; Hawkes *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2011 y Ueno *et al.*, 2007). Este hecho puede ser debido a que las bacterias productoras de H<sub>2</sub> (*Clostridium* sp.) se seleccionan entre las diferentes poblaciones de microorganismos implicados en la digestión anaerobia en TRH bajos.

**Tabla 4.6** Condiciones de operación y principales parámetros medidos

TRH (h)	PH (mLH <sub>2</sub> /mL <sub>reactor</sub> /d)	PEH (mLH <sub>2</sub> /gSV <sub>añadido</sub> )	Composición del biogás (%)	
			H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
72	0.123 ± 0.09	45.631 ± 26.89	23.61 ± 10.46	76.38 ± 10.46
24	0.758 ± 0.391	97.424 ± 52.08	40.49 ± 16.84	59.50 ± 16.84
12	0.92 ± 0.494	55.435 ± 33.35	28.58 ± 11.81	71.41 ± 11.81
6	1.13 ± 0.986	31.64 ± 30.30	20.35 ± 13.52	79.64 ± 13.52

La figura 4.6 muestra la composición de biogás a través de las etapas experimentales. Como puede comprobarse, el porcentaje de producción más alto se observa en el rango de TRH de 24 h, siendo los valores máximos 52.40 y 52.50% en los ciclos 10 y 12, cifras que resultan semejantes a los porcentajes reportados por otros autores (Romero-Aguilar *et al.*, 2013; Shin *et al.*, 2004 y Gómez *et al.*, 2006) en sus experimentos sobre la producción de hidrógeno mediante fermentación oscura de residuos de alimentos o residuos sólidos urbanos.

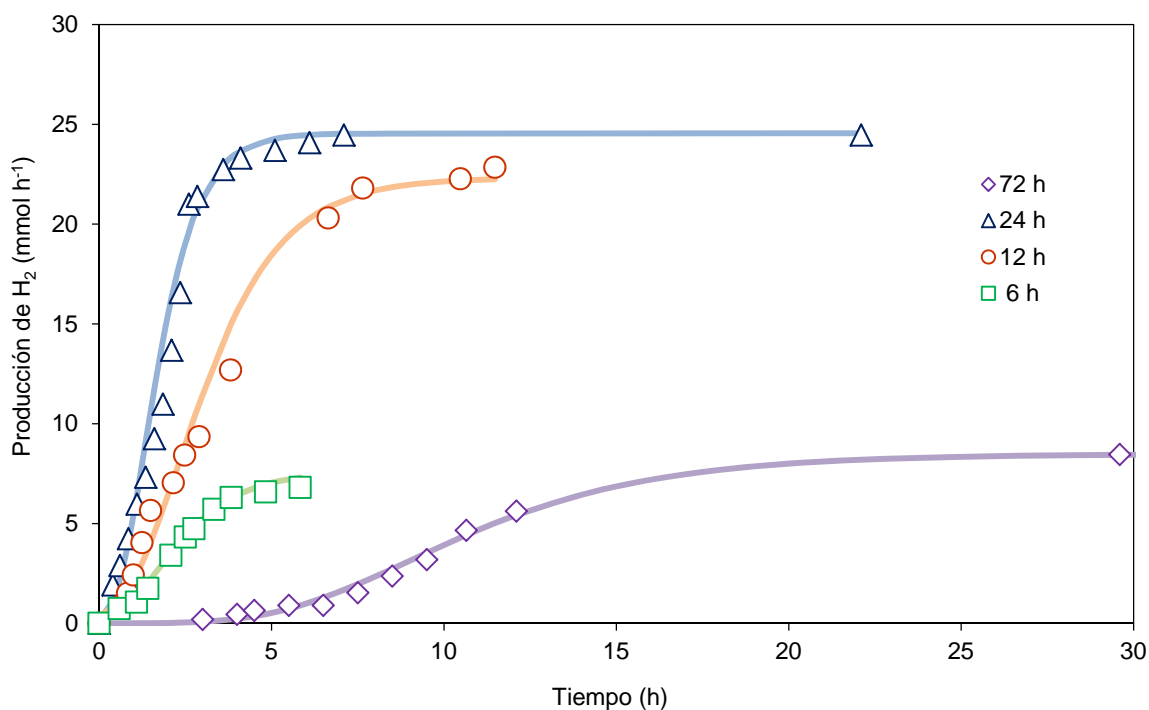


**Figura 4.6** Producción de H<sub>2</sub> para los diferentes TRH evaluados

La mayor producción por gramo de SV añadido de RSO se obtuvo en el TRH de 24 h alcanzando un valor máximo de 192.83 mLH<sub>2</sub>/gSV<sub>añadido</sub>. La producción específica de hidrógeno máxima el caso de los TRH de 72, 12 y 6 h fue de 101.822, 113.63 y 76.92 mLH<sub>2</sub>/gSV<sub>añadido</sub>, respectivamente. Los valores promedio se pueden comprobar en la tabla 4.6. Se observó también que la mayor cantidad en la producción de H<sub>2</sub> (PH) se alcanzó en el TRH de 6 h con 2.6 mLH<sub>2</sub>/mL<sub>reactor</sub>/d. Los valores promedio de PH fueron 0.123 ± 0.09, 0.758 ± 0.391, 0.920 ± 0.494 y 1.130 ± 0.986 mLH<sub>2</sub>/mL<sub>reactor</sub>/d para TRH de 72, 24, 12 y 6 h, respectivamente.

### 4.3.2 Efecto del TRH en la producción de hidrógeno (cinéticas)

Para evaluar la producción de hidrógeno en respuesta a los diferentes TRH, se realizó el análisis cinético utilizando la ecuación modificada de Gompertz (ecuación 1.7). La figura 4.7 muestra la tendencia de los datos obtenidos durante los diferentes TRH. Se puede apreciar que la mayor producción de  $\text{mmolH}_2 \text{ h}^{-1}$  se generó durante los ciclos de 24 y 12 h ( $33.83$  y  $20.53 \text{ mmolH}_2/\text{h}$ ), mientras que para los ciclos de 72 y 6 h la cantidad máxima producida fue de  $16.50$  y  $12.61 \text{ mmolH}_2/\text{h}$ , respectivamente. No hay periodos de latencia ( $\lambda$ ) observados para las condiciones de 6, 12 y 24 h; sin embargo, se observó para el TRH de 72 h un período de tiempo hasta de 5.1 h.



**Figura 4.7** Ejemplo de las cinéticas de producción de  $\text{H}_2$  a partir de los RSO. TRH de 72 h (ciclo 1), 24 h (ciclo 9), 12 h (ciclo 45) y 6 h (ciclo 59)

Dong *et al.*, (2009) estudiaron la producción de hidrógeno a partir de siete variedades de los componentes individuales de los RSO utilizando experimentos por lotes a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  y observaron que la producción específica de  $\text{H}_2$  (PEH) presentó fluctuaciones en un rango de valores de 49 a  $112 \text{ mLH}_2/\text{gSV}/\text{d}$ . La diferencia en las tasas específicas obtenidas en la

presente investigación y los y otros estudios se puede atribuir a la naturaleza compleja de los RSO y el inóculo utilizado en cada caso.

### 4.3.3 Productos intermediarios de la fermentación

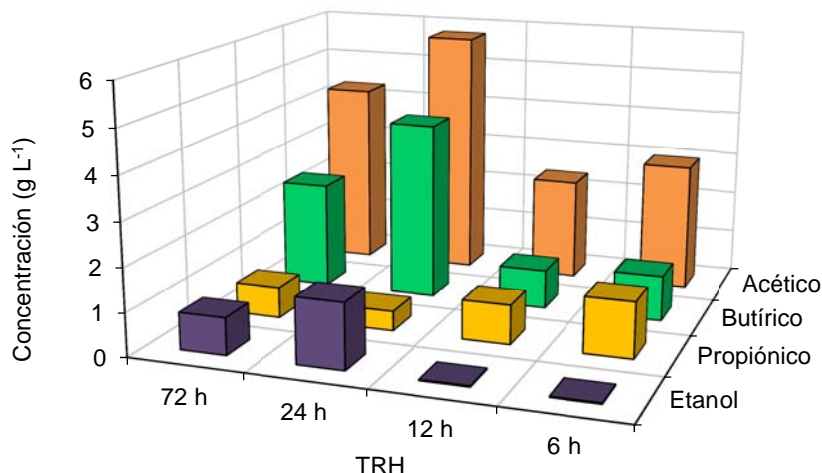
La producción de hidrógeno genera; a su vez, producción de AGVs y alcoholes durante la fermentación anaerobia de sustrato orgánico (RSO, en este caso). La concentración y distribución de AGVs se han utilizado como un indicador útil para la vigilancia de la producción de hidrógeno (Chen *et al.*, 2002), los valores obtenidos en este estudio se muestran en la tabla 4.7. Los resultados indican que la mayor cantidad de ácido acético y butírico se obtuvo en el TRH de 24 h. Por otra parte, la mayor producción de ácido propiónico se observó en los ciclos de TRH de 6 h (1.29 g/L), seguido de 12 h (0.9 g/L), lo cual está relacionado con la disminución de producción de H<sub>2</sub>. Se sabe que los AGVs pueden ser estimulantes, inhibidores o incluso tóxicos para el proceso fermentativo dependiendo de sus concentraciones.

**Tabla 4.7** Producción de AGVs para los distintos TRH evaluados

TRH (h)	Concentración AGVs (g/L)						
	Acetona	Etanol	Acético	Propiónico	Isobutírico	Butírico	Isovalérico
72	0.27±0.13	0.85±0.45	4.30±1.7	0.72±0.37	0.45±0.26	2.46±1.89	0.34±0.08
24	0.80±0.41	1.51±1.17	5.77±4.06	0.46±0.16	0.82±0.35	4.13±3.86	0.46±0.07
12	0.03±0.004	0.023±0.01	2.37±2.8	0.90±0.18	0.015±0.0	0.90±0.13	0.03±0.01
6	0.02±0.009	0.023±0.02	2.97±0.17	1.29±0.14	0.069±0.05	1.05±0.01	0.065±0.009

Sin embargo, en un nivel alto puede llevar a una inhibición severa en la fermentación. Los efectos de los productos intermediarios sobre la actividad fermentativa están asociados con la capacidad tampón (por ejemplo, valores de pH y alcalinidad). La metanogénesis es una de las barreras para la producción de AGVs que es necesario superar. La figura 4.8 muestra la evolución de la concentración de los ácidos grasos volátiles en función de los diferentes TRH evaluados en este estudio.

Se observó una importante producción de acético y butírico en el TRH de 12 h (4.18 y 5.76 g/L, respectivamente). Es evidente notar que la cantidad de acético generada es la mayor en los TRH evaluados. Se ha explicado anteriormente que bacterias homoacetogénicas como *Clostridium aceticum* pueden ser capaces de crecer usando H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> para generar ácido acético y agua (Sim *et al.*, 2007). Los resultados anteriores indican que la producción de hidrógeno se asocia con la producción de ácido acético.



**Figura 4.8** Producción de AGVs en los diferentes TRH evaluados

En general, se sabe que numerosos parámetros para la producción fermentativa de H<sub>2</sub> tienen el potencial de afectar la evolución que envuelven las rutas metabólicas para lograr altos rendimientos. Los principales factores a considerar son pH, temperatura, el origen/tipo/pretratamiento del inóculo, la configuración del reactor, el modo de operación y la combinación de procesos adicionales.

En cuanto a los indicadores de proceso se han propuesto una variedad de parámetros en la literatura que se han utilizado para evaluar el rendimiento desde diferentes perspectivas, que abarca desde el potencial de producción del proceso, hasta la eficiencia de conversión de energía. Con respecto a las cuestiones antes mencionadas, se deben hacer considerables esfuerzos en la comunidad científica para armonizar los métodos de descripción adoptadas, con el fin de permitir la comparación de resultados de diferentes fuentes y la obtención de una mejor comprensión de las numerosas interrelaciones entre los factores del proceso de fermentación de los RSO.

## V. CONCLUSIONES

Como conclusión general se puede decir que se evaluaron cuatro distintos TRH para llevar a cabo la producción biológica de hidrógeno partiendo de los residuos sólidos orgánicos obtenidos de la cafetería de la UNAM, campus Juriquilla, encontrándose que en los cuatro TRH experimentados hubo producción de hidrógeno.

Asimismo, se evaluaron distintos pretratamiento para el inóculo; dos inhibidores químicos de la metanogénesis y uno de choque térmico, y se determinó el mejor de ellos para la producción de hidrógeno observándose que el pretratamiento más adecuado de los evaluados fue el de choque térmico.

Por otro lado, se caracterizaron los RSO de acuerdo con lo establecido a la NMX-AA-015-1985 (método de cuarteo), encontrándose que el porcentaje predominante de las fracciones corresponde al de frutas y verduras, seguido de la fracción mixta.

Finalmente, se evaluaron los parámetros fisicoquímicos y la composición del biogás en el arranque y operación del biorreactor para la producción de hidrógeno a partir de los RSO de una cafetería hallándose la presencia de hidrógeno y dióxido de carbono y nula producción de metano en la composición del biogás, así como la presencia de AGVs predominantemente ácido acético y butírico.



## **VI. RECOMENDACIONES**

Dadas las incertidumbres existentes sobre la influencia individual y conjunta de diversos parámetros de operación (pH, temperatura, el origen/tipo/pretratamiento del inóculo, la configuración del reactor, el modo de operación y la combinación de procesos adicionales), la predicción del rendimiento de los reactores a gran escala sobre la base de los datos existentes puede llegar a ser poco confiables.

Se sugiere completar el tratamiento de los residuos sólidos orgánicos con un proceso acoplado de metanogénesis para la mineralización completa de la materia orgánica remanente del proceso anaerobio realizado en este estudio.

Adicional a los residuos de materia orgánica que resultan del proceso de anaerobiosis, efluentes con sustancias intermediarias tales como AGVs poseen la capacidad de emplearse en el campo de la bioenergía. De este modo, se recomienda el uso de los residuos orgánicos (municipales, de alimentos, agrícolas y de jardinería) para la producción de AGVs a fin de emplearse en otros procesos tales como celdas electroquímicas microbianas para la producción alternativa de hidrógeno.

## VII. REFERENCIAS

- Akutsu Y, Li Y, Tandukar M, Kubota K, Harada H. (2008). Effects of seed sludge on fermentative characteristics and microbial community structures in thermophilic hydrogen fermentation of starch. *Int J Hydrogen Energy*. 33(22): 6541-6548
- Alzate-Gaviria LM, Sebastian PJ, Perez-Hernandez A, Eapen D. (2007). Comparison of two anaerobic systems for hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste and synthetic wastewater. *Int J Hydrogen Energy*. 32: 3141-3146
- Angenent LT, Karim K, Al-Dahhan MH, Wrenn BA, Domiguez-Espinosa R. (2004). Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol*. 22:477-485
- APHA. (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. In: Eaton AD, Clesceri, AE, Rice EW, Greenberg AE. (Eds.), American Public Health Association, 21st ed. American Water Works Association and Water Environment Federation, Washington D.C.
- Argun H, Kargi F. (2011). Biohydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *Int J Hydrogen Energy*. 13(46):7443-7459
- Benemann, J. (1996). Hydrogen biotechnology: progress and prospects. *Nature Biotechnol*. 14:1101-1103
- Blakely RL. (1969). The biochemistry of folic acid and related pteridines. Frontiers of biology series, vol 13. Wiley, New York, pp 1-569
- Brosseau JD, Yan JY, Lo KV. (1986). The relationship between hydrogen gas and butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *Biotechnol Bioeng*. 28: 305-310
- Buitrón G, Carvajal C. (2010). Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Biores Technol*. 23:9071-9077
- Chang JJ, Wu JH, Wen FS, Hung KY, Chen YT, Hsiao CL, Lin CY, Huang CC. (2008). Molecular monitoring of microbes in a continuous hydrogen-producing system with different hydraulic retention time. *Int J Hydrogen Energy*. 33(5):1579-1585
- Chang JS, Lee KS, Lin PJ. (2002). Biohydrogen production with fixed-bed-bioreactors. *Int J Hydrogen Energy*. 27(11/12):1167-1174
- Chen CC, Lin CY, Chang JS. (2001). Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. *Appl Microbiol Biotechnol*. 57:56-64
- Chen CC, Lin CY, Lin MC. (2002). Acid–base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process. *Appl Microbiol Biotechnol*. 58:224-228
- Chen CY, Yang MH, Yeh KL, Liu CH, Chang JS. (2008b). Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes. *Int J Hydrogen Energy*. 33:4755-4762
- Chen X, Sun YQ, Xiu ZL, Li XH, Zhang DJ. (2006). Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *Int J Hydrogen Energy*. 31:539–49
- Chen YY, Liu H, Du GC, Chen J. (2007). Acetate accumulation and variation of bacterial community in anaerobic fermentation sludge by addition of 2-bromoethanesulfonate. *Chin J Appl Environ Biol*. 13:108-111

- Chidthaisong A, Conrad R. (2000). Specificity of chloroform 2-bromoethanesulfonate and fluoroacetate to inhibit methanogenesis and other anaerobic processes in anoxic rice field soil. *Soil Biol Biochem.* 32:977-988
- Chong M, Rahim RA, Shirai Y, Hassan MA. (2009). Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent. *Int J Hydrogen Energy.* 34(2):764-771
- Chou C, Wang C, Huang C, Lay J. (2008). Pilot study of the influence of stirring and pH on anaerobes converting high-solid organic wastes to hydrogen. *Int J Hydrogen Energy.* 33 (5):1550-1558
- Chu CF, Li YY, Xu KQ, Ebie Y, Inamori Y, Kong HN. (2008). A pH-and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. *Int J Hydrogen Energy.* 33(18):4739-4746
- Cohen A, Distel B, Vandeursen A, Breure AM, Vanandel JG. (1985). Role of anaerobic spore-forming bacteria in the acidogenesis of glucose-changes induced by discontinuous or low-rate feed supply. *Antonie van Leeuwenhoek.* 51(2):179-92
- Collet C, Adler N, Schwitzguébel JP, Péringer P. (2004). Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *Int J Hydrogen Energy.* 29:1479-1485
- Conrad R, Klose M, Claus P. (2000). Phosphate inhibits acetotrophic methanogenesis on rice roots. *Appl Environ Microbiol.* 66:828-831
- Contreras A, Yigit S, Ozay K, Veziroglu TN. (1997). Hydrogen as aviation fuel: a comparison with hydrocarbon fuels. *Int J Hydrogen Energy.* 22(10/11):1053-1060
- Cord-Ruwisch R, Seitz HJ, Conrad R. (1988). The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Arch Microbiol.* 149:350-357
- Das D, Veziroglu TN. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *Int J Hydrogen Energy.* 33(21): 6046-6057
- Das D. (2009). Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization. *Int J Hydrogen Energy.* 34:7349-7357
- Davila Vazquez G, Alatrisme Mondragon F, de Leon Rodriguez A, Razo Flores E. (2008). Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: influence on initial substrate concentration and pH. *Int J Hydrogen Energy.* 33:4989-4997
- de Vrije T, Claassen PAM. (2003). Dark hydrogen fermentations. In: Bio-methane and bio-hydrogen: Status and perspectives of biological methane and hydrogen production. Ed. Reith JH. Wiffels RH. Barthen H. Dutch Biological Hydrogen Foundation. The Netherlands. 103-123 p
- DeGraaf WD, Wellsbury P, Parkes RJ, Cappenberg TE. (1996). Comparison of acetate turnover in methanogenic and sulfatereducing sediments by radiolabeling and stable isotope labeling and by use of specific inhibitors: evidence for isotopic exchange. *Appl Environ Microbiol.* 62:772-777
- Diekert G, Wohlfarth G. (1994). Metabolism of homoacetogens. *Antonie Leeuwenhoek.* 66(1):209-21
- Doi T, Matsumoto H, Abe J, Morita S. (2009). Feasibility study on the application of rhizosphere microflora of rice for the biohydrogen production from wasted bread. *Int J Hydrogen Energy.* 34(4):1735-1743

- Dong L, Zhenhong Y, Yongming S, Xiaoying K, Yu Z. (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *Int J Hydrogen Energy*. 34:812-820
- Edwards PP, Kuznetsov VL, David WIF, Brandon NP. (2008). Hydrogen and fuel cells: towards a sustainable energy future. *Energy Policy*. 36:4356-4362
- Evvyernie D, Yamazaki S, Morimoto K, Karita S, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K. (2000). Identification and characterization of *Clostridium paraputrificum* M-21, a chitinolytic, mesophilic and hydrogen producing bacterium. *J Biosci Bioeng*. 89: 596-601
- Fan Y, Li C, Lay J, Hou H, Zhang G. (2004). Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost. *Bioresour Technol*. 91(2):189-193
- Fan Y, Zhang Y, Zhang S, Hou H, Ren B. (2006). Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Bioresour Technol*. 97(3):500-505
- Ferchichi ME, Gil GH, Hintz W. (2005). Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *J Biotechnol*. 120:402-409
- Fountoulakis MS, Manios T. (2009). Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agroindustrial by-products co-digested with crude glycerol. *Biores Technol*. 100:3043-3047
- Gadhamshetty V, Arudchelvam Y, Nirmalakhandan N, Johnson DC. (2010). Modeling dark fermentation for biohydrogen production: ADM1-based model vs. Gompertz model. *Int J Hydrogen Energy*. 2(35):479-490
- Gómez X, Morán A, Cuetos MJ, Sanchez ME. (2006). The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: a two-phase process. *J Power Sources*. 157:727-732
- Gómez, X., Cuetos, M.J., Prieto, J.I., Morán, A. (2009). Bio-hydrogen production from waste fermentation: mixing and static conditions. *Renew Energy*. 34:970-975
- Gonzalez N, Galindo J, Gonzalez R, Sosa A, Moreira O, Delgado D, Martin E, Sanabria C. (2006). Utilization of the real time PCR and in vitro gas production technique for determining the effect of bromoethanesulfonic acid on the methanogenesis and rumen microbial population. *Cuban J Agric Sci*. 40:171-177
- Gottschalk G. (1986). Bacterial metabolism. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin: Springer
- Gujer W, Zenhder A. (1983). Conversion process in anaerobic digestion. *Wat Sci Technol*. 15:127-167
- Guo XM, Trably E, Latrille E, Carrère H, Steyer JP. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: a review. *Int J Hydrogen Energy*. 35: 10660-10673
- Hallenbeck PC, Benemann JR. (2002). Biological hydrogen production: fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrogen Energy*. 27:1185-1193
- Han SK, Shin HS. (2004). Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. *Int J Hydrogen Energy*. 29:569-577
- Han SK, Shin HS. (2004b). Performance of an innovative two-stage process converting food waste to hydrogen and methane. *J Air Waste Manage Assoc*. 54:242-249
- Hartmann H. (2002). Anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste with recirculation of process water. Environmental Microbiology & Biotechnology Research Group. Technical University of Denmark. *PhD Thesis*

- Hawkes FR, Dinsdale R, Hawkes DL, Hussy I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *Int J Hydrogen Energy*. 27:1339-1347
- Hawkes FR, Hussy I, Kyazze G, Dinsdale R, Hawkes DL. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. *Int J Hydrogen Energy*. 32(2):172-184
- Hong C, Haiyun W. (2010). Optimization of volatile fatty acid production with cosubstrate of food wastes and dewatered excess sludge using response surface methodology. *Bioresour Technol*. 101:5487-5493  
<http://www.sigmaldrich.com/mexico.html>
- Hu B, Chen SL. (2007). Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *Int J Hydrogen Energy*. 32:3266-3273
- Irvine RL, Ketchum LH, Jr. (1998). Sequencing Batch Reactors for Biological Wastewater Treatment. *Crit Rev Environ Control*. 18:255
- Irvine RL, Wilderer PA, Flemming HC. (1997). Controlled unsteady-state processes An overview. *Water Sci Technol*. 35(1):1-10
- Ivanova G, Rákhely G, Kovács KL. (2009). Thermophilic biohydrogen production from energy plants by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and comparison with related studies. *Int J Hydrogen Energy*. 34(9):3659-70
- Izumi K, Okishio YK, Nagao N, Niwa C, Yamamoto S, Toda T. (2010). Effects of particle size on anaerobic digestion of food waste. *Int BiodeterBiodeg*. 64:601-608
- Jo JH, Lee DS, Park D, Choe WS, Park JM. (2008). Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods. *Bioresour Technol*. 99:2061-2066
- Jung KW, Kim DH, Kim SH, Shin SH. (2011). Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresour Technol*. 102:8612–8620
- Kapdan IK, Kargi F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb Technol*. 38:569-582
- Karagiannidis A, Perkoulidis G. (2009). A multi-criteria ranking of different technologies for the anaerobic digestion for energy recovery of the organic fraction of municipal solid wastes. *Bioresour Technol*. 100:2355-2360
- Karakashev D, Trably E, Angelidaki I. (2009). A strict anaerobic extreme thermophilic hydrogen-producing culture enriched from digested household waste. *J Appl Microbiol*. 106(3):1041-1049
- 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(3):953-962
- Kaspar HF, K. Wuhrmann. (1978). Kinetic parameters and relative turnover of some important catabolic reactions in digesting sludge. *Appl Environ Microbiol*. 36:1-7
- Kaushik N, Debabrata D. (2004). Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Appl Microbiol Biotechnol*. 65:520-529
- Kim DH, Kim SH, Han SH, Shin HS. (2005a). Performance of pilot-scale H<sub>2</sub>-fermenter: C/N ratio effect & alkaline shock treatment. Proceedings of the 2005 Biohydrogen Technology Symposium and the 3<sup>rd</sup> International Workshop on Innovative Anaerobic Technology, 9-11<sup>th</sup> December 2005. Taichung, Taiwan. 68-74 p

- Kim DH, Kim SH, Kim KY, Shin HS. (2010). Experience of a pilot-scale hydrogen producing anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) treating food waste. *Int J Hydrogen Energy*. 35:1590-1594
- Kim DH, Wu J, Jeong KW, Kim MS, Shin HS. (2011a). Natural inducement of hydrogen from food waste by temperature control. *Int J Hydrogen Energy*. 36:10666–10673
- Kim JO, Kim YH, Yeom SH, Song BK y Kim IH. (2006). Enhancing continuous hydrogen gas production by the addition of nitrate into an anaerobic reactor. *Process Biochem*. 41:1208-12
- Kim SH, Han SK, Shin HS. (2004). Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge. *Int J Hydrogen Energy*. 29 (15):1607-1616
- Kim SH, Han SK, Shin HS. (2008). Optimization of continuous hydrogen fermentation of food waste as a function of solids retention time independent of hydraulic retention time. *Process Biochem*. 43:213-218
- Kim SH, Shin HS. (2008). Effects of base-pretreatment on continuous enriched culture for hydrogen production from food waste. *Int J Hydrogen Energy*. 33(19): 5266-5274
- Kleerebezem R, van Loosdrecht M. (2007). Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Curr Opin Biotechnol*. 18:207-212
- Kuo W, Cheng K. (2007). Use of respirometer in evaluation of process and toxicity of thermophilic anaerobic digestion for treating kitchen waste. *Bioresour Technol*. 98:1805-1811
- Lay J, Fan K, Hwang J, Chang J, Hsu P. (2005). Factors affecting hydrogen production from food wastes by *Clostridium*-rich composts. *J Environ Eng*. 131(4):595-602
- Lay JJ, Lee YJ, Noike T. (1999). Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Res*. 11(33):2579-2586
- Lay JJ. (2000). Modeling and optimization of anaerobic sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnol Bioeng*. 68(3):269-278
- Lee KS, Hsu YF, Lo YC, Lin PJ, Lin CY, Chang JS. (2008). Exploring optimal environmental factors for fermentative hydrogen production from starch using mixed anaerobic microflora. *Int J Hydrogen Energy*. 33:1565-1572
- Lee KS, Lin PJ, Chang JS. (2006). Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. *Int J Hydrogen Energy*. 31:465-72
- Lee YJ, Miyahara K, Noike T. (2002). Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. *J Chem Technol Biotechnol*. 77: 694–698
- Lee YW, Chung J. (2010). Bioproduction of hydrogen from food waste by pilot-scale combined hydrogen/methane fermentation. *Int J Hydrogen Energy*. 35:11746-11755
- Lee ZK, Li SL, Kuo PC, Chen IC, Tien YM, Huang YJ, Chuang CP, Wong SC, Cheng SS. (2010). Thermophilic bio-energy process study on hydrogen fermentation with vegetable kitchen waste. *Int J Hydrogen Energy*. 35:13458-13466
- Levin DB, Pitt L, Love M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical. *Int J Hydrogen Energy*. 29:173-185
- LGPGIR. (2003). Ley general para la prevención y gestión integral de los residuos. Última reforma publicada DOF 07-06-2013
- Li C, Fang HHP. (2007). Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 37(1):1-39

- Li D. (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *Int J Hydrogen Energy*. 34(2): 812-820
- Li M, Zhao Y, Guo Q, Qian X, Niu D. (2008a). Bio-hydrogen production from food waste and sewage sludge in the presence of aged refuse excavated from refuse landfill. *Renew Energy*. 33(12):2573-9
- Li SL, Kuo SC, Lin JS, Lee ZK, Wang YH, Cheng SS. (2006). Performance evaluation for hydrogen fermentation process treating kitchen waste. The 2006 Asian biohydrogen symposium, November 19, 2006. Feng Chia University, Taiwan. 108-120 p
- Li SL, Kuo SC, Lin JS, Lee ZK, Wang YH, Cheng SS. (2008b). Process performance evaluation of intermittent–continuous stirred tank reactor for anaerobic hydrogen fermentation with kitchen waste. *Int J Hydrogen Energy*. 33:1522-1531
- Li YY, Lam S, Fang HHP. (1996). Interactions between methanogenic, sulfate-reducing and syntrophic acetogenic bacteria in the anaerobic degradation of benzoate. *Wat Res*. 30:1555-1562
- Lin CY, Chang RC. (1999). Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. *J Chem Technol Biotechnol*. 74:498-500
- Lin CY, Chen HP. (2006). Sulfate effect on fermentative hydrogen production using anaerobic mixed microflora. *Int J Hydrogen Energy*. 31:953-960
- Lin CY, Lay CH. (2004). Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *Int J Hydrogen Energy*. 29:275-281
- Lin PY, Whang LM, Wu YR, Ren WJ, Hsiao CJ, Li SL, Chang JS. (2007). Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: metabolic study and mathematical model simulation. *Int J Hydrogen Energy*. 32:1728-1735
- Linke B, Heiermann M, Mumme J. (2006). Results of monitoring the pilot plants Pirow and Clausnitz. In: Rohstoffe, F.N. (Ed.), Solid-state Digestion–state of the art and further R&D requirements. Vol. 24. Gülzower Fachgespräche, pp. 112-130
- Liu D, Liu D, Zeng RJ, Angelidaki I. (2006). Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process. *Water Res*. 40:2230-2236
- Liu H, Wang J, Wang A, Chen J. (2011). Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 89:1333-1340
- Liu YC, Whitman WB. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann NY Acad Sci*. 1125:171-189
- Logan B, Oh SE, Kim IK, van Ginkel SW. (2002). Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environ Sci Technol*. 36(11):2530-2535
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. (2009). Brock biology of microorganisms. 12th ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall Inc.
- Maintinguer SI, Fernandes BS, Duarte ICS, Saavedra NK, Adorno MAT, Varesche MB. (2008). Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *Int J Hydrogen Energy*. 33:4309-4317
- Metcalf & Eddy. Tchobanoglous G, Burton FL (eds) (2003). Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse. Mc Graw Hill, New York

- Mizuno O, Dinsdale R, Hawkes FR, Hawkes DL, Noike T. (2000). Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresource Technol.* 73(1), 59-65
- Mizuno O, Li YY, Noike T. (1994). Effects of sulfate concentration and sludge retention time on the interaction between methane production and sulfate reduction for butyrate. *Wat Sci Tech.* 30(8):45-54
- Mizuno O, Li YY, Noike T. (1998). The behavior of sulfate-reducing bacteria in acidogenic phase of anaerobic digestion. *Water Res.* 32(5):1626-34
- Mohan SV, Mohanakrishna G, Goud RK, Sarma PN. (2009). Acidogenic fermentation of vegetable based market waste to harness biohydrogen with simultaneous stabilization. *Biores Technol.* 100:3061-3068
- Moreno-Andrade I, Buitrón G. (2011). Influence of particle size on biohydrogen production from food waste. *Proceedings of the X Latin-American Workshop and Symposium of Anaerobic Digestion.* 23-27/10/2011 Ouro Preto, Brasil
- Nagar-Anthal KR, Worrell VE, Teal R, Nagle DP. (1996). The pterin lumazine inhibits growth of methanogens and methane production. *Arch Microbiol.* 166:136-140
- Nandi R, Sengupta S. (1998). Microbial production of hydrogen: an overview. *Crit Rev Microbiol.* 24(1):61-84
- Nath K, Das D. (2004). Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Appl Microbiol Biotechnol.* 65(5):520-529
- Noike T, Mizuno O. (2000). Hydrogen fermentation of organic municipal wastes. *Water Sci Technol.* 42(12):155-162
- Noike T, Takabatake H, Mizuno O, Ohba M. (2002). Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *Int J Hydrogen Energy.* 27:1367-1371
- Norma Mexicana NMX-AA-015-1985. Protección al Ambiente -Contaminación del Suelo- Residuos Sólidos Municipales - Muestreo - Método de Cuarteo
- Norma Mexicana NMX-AA-022-1985. Protección al Ambiente -Contaminación del Suelo- Residuos Sólidos Municipales. Selección y Cuantificación de Subproductos
- Norma Mexicana NMX-AA-061-1985. Protección al Ambiente -Contaminación del Suelo- Residuos Sólidos Municipales- Determinación de la Generación de Residuos
- Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005. Características, procedimiento de identificación, clasificación y listados de los residuos peligrosos
- Odom JM, Singleton R. (1992). *The Sulfate-reducing Bacteria: Contemporary Perspectives.* Springer Verlag
- Oh SE, Lyer P, Bruns MA, Logan BE. (2004). Biological hydrogen production using a membrane bioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 87(1):119-127
- Oh SE, Van Ginkel S, Logan BE. (2003). The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environ Sci Technol.* 37(22):5186-5190
- Okamoto M, Miyahara T, Mizuno O, Noike T. (2000). Biological hydrogen potential of materials characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes. *Water Sci Technol.* 41(3):25-32
- Orcutt B, Meile C. (2008). Constraints on mechanisms and rates of anaerobic oxidation of methane by microbial consortia: processbased modeling of ANME-2 *archaea* and sulfate reducing bacteria interactions. *Biogeosciences.* 5:1587-1599
- Oremland RS, Capone DG. (1998). Use of specific inhibitors in biogeochemistry and microbial ecology. *Adv Microb Ecol.* 10:285-383



- Örlygsson J, Houwen FP, Svensson BH. (1995). Thermophilic anaerobic amino acid degradation: deamination rates and end product formation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 43:235-41
- O-Thong S, Prasertsan P, Karakashev D, Angelidaki I. (2008). Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum PSU-2. *Int J Hydrogen Energy.* 33(4):1204-14
- Pakarinen O, Lehtomäki A, Rintala J. (2008). Batch dark fermentative hydrogen production from grass silage: the effect of inoculum, pH, temperature and VS ratio. *Int J Hydrogen Energy.* 33(2):594-601
- Parawira W, Murto M, Zvauya R, Mattiasson B. (2004). Anaerobic batch digestion of solid potato waste alone and in combination with sugar beet leaves. *Renew Energy.* 29:1811-1823
- Park W, Hyun SH, Oh S, Logan BE, Kim IS. (2005). Removal of headspace CO<sub>2</sub> increases biological hydrogen production. *Environ Sci Technol.* 39(12):4416-4420
- Parkin GF, Lynch NA, Kuo WC, Van Keren EL, Bhattacharya SK. (1990). Interaction between sulfate reducers and methanogens fed acetate and propionate. *Research J. WPCF* 62:780-788
- Ramos C, Buitrón G, Moreno I, Chamy R. (2012). Effect of the initial total solids concentration and initial pH on the bio-hydrogen production from cafeteria food waste. *Int J Hydrogen Energy.* 37:13288-13295
- Ramsay IR, Pullammanappallil PC. (2001). Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: derivation of stoichiometry. *Biodegradation.* 12:247-57
- Rechtenbach D, Meyer M, Stegmann R. (2008). (Dis-) continuous production of biohydrogen and biomethane from raw and waste materials by fermentation. In: *Proceedings of Venice 2008 Second International Symposium on Energy from Biomass and Waste*, Venice (I), 17-20 November
- Romero Aguilar MA, Fdez-Güelfo LA, Álvarez-Gallego CJ, Romero García LI. (2013). Effect of HRT on hydrogen production and organic matter solubilization in acidogenic anaerobic digestion of OFMSW. *Chem Eng J.* 219: 443-449
- Sauer M, Porro D, Mattanovich D, Branduardi P. (2008). Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol.* 26:100-108
- Scholten JCM, Conrad R, Stams AJM. (2000). Effect of 2-bromoethane sulfonate, molybdate and chloroform on acetate consumption by methanogenic and sulfate-reducing populations in freshwater sediment. *FEMS Microbiol Ecol.* 32:35-42
- Schulz S, Conrad R. (1996) Influence of temperature on pathways to methane production in the permanently cold profundal sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiol Ecol.* 20:1-14
- SEMARNAT. (2009). Plan Nacional de Prevención y Gestión Integral de Residuos 2009-2012
- Setlow P. (2003). Spore germination. *Curr Opinion Microbiol.* 6:550-556
- Shi Y, Zhao X-T, Cao P, Hu Y, Zhang L, Jia Y, Lu Z. (2009). Hydrogen bioproduction through anaerobic microorganism fermentation using kitchen wastes as substrate. *Biotechnol Lett.* 31:1327-1333
- Shin HS, Kim SH, Han SK, Kim HW, Oh SE. (2005). Current technical development in continuous H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production from organic waste. *Proceedings of The 2005 Biohydrogen Technology Symposium and the 3<sup>rd</sup> International Workshop on*

- Innovatove Anaerobic Technology, 9-11<sup>th</sup> December 2005. Taichung, Taiwan. 28-36 p
- Shin HS, Youn JH, Kim SH. (2004). Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int J Hydrogen Energy*. 29:1355-1363
- Shin HS, Youn JH. (2005). Conversion of food waste into hydrogen by thermophilic acidogenesis. *Biodegradation*. 16(1):33-44
- Shin HS, Youn JH. (2006). Conversion of food waste into hydrogen by thermophilic acidogenesis. *Biodegradation*. 40: 2230-2236
- Silk J. (1994). A short history of the universe. New York: Scientific American Library.
- Sim JH, Kamaruddin AH, Long WS, Najafpour G. (2007). *Clostridium aceteticum* - a potential organism in catalyzing carbon monoxide to acetic acid: application of response surface methodology. *Enzym Microb Tech*. 40:1234-1243
- Tang G, Huang J, Sun Z, Tang Q, Yan C, Liu G. (2008). Biohydrogen production from cattle wastewater by enriched anaerobic mixed consortia: influence of fermentation temperature and pH. *J Biosci Bioeng*. 106(1):80-87
- Temudo MF, Kleerebezem R, Loosdrecht MV. (2007). Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: a chemostat study. *Biotechnol Bioeng*. 98(1):69-79
- Uberoi VU, Bhattacharya SK. (1995). Interaction among sulfate reducers, acetogens, and methanogens in anaerobic propionate systems. *Wat Environ Res*. 67:330-339
- Ueno Y, Otsuka S, Morimoto M. (1996). Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture. *J Ferment Bioeng*. 82(2):194-197
- Ueno Y, Tatara M, Fukui H, Makiuchi T, Goto M, Sode K. (2007). Production of hydrogen and methane from organic solid wastes by phase-separation of anaerobic process. *Bioresour Technol*. 98:1861-1865
- Ungerfeld EM, Rust SR, Boone DR, Liu Y. (2004). Effects of several inhibitors on pure cultures of ruminal methanogens. *J Appl Microbiol*. 97:520-526
- Valdez-Vazquez I, Poggi-Varaldo HM. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renew Sust Energ Rev*. 13:1000-10013
- Valdez-Vazquez I, Rios-Leal E, Carmona-Martinez A, Munoz-Paez KM, Poggi-Varaldo HM. (2006). Improvement of biohydrogen production from solid wastes by intermittent venting and gas flushing of batch reactors headspace. *Environ Sci Technol*. 40(10):3409-15
- Valdez-Vazquez I, Rios-Leal E, Esparza-Garcia F, Cecchi F, Poggi-Varaldo HM. (2005). Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H<sub>2</sub> production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime. *Int J Hydrogen Energy*. 30:1383-1391
- van Ginkel S, Sung S, Lay JJ. (2001). Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environ Sci Microbiol*. 35:4726-4730
- Venkata Mohan S, Lalit Babu V, Sarma PN. (2007). Anaerobic biohydrogen from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor (AnSBR): Effect of the organic loading rate. *Enzyme Microb Tech*. 41:506-515
- Veziroglu TN, Barbir F. (1998). Hydrogen energy technologies. Emerging technology series. Vienna, Austria
- Vijayaraghavan K, Ahmad D, Bin Ibrahim MK. (2006a). Biohydrogen generation from jackfruit peel using anaerobic contact filter. *Int J Hydrogen Energy*. 31(5):569-579

- Vijayaraghavan K, Ahmad D, Khairil Bin Ibrahim M, Naemmah Binti Herman H. (2006). Isolation of hydrogen generating microflora from cow dung for seeding anaerobic digester. *Int J Hydrogen Energy*. 31(6):708-720
- Wang CC, Chang CW, Chu CP, Lee DJ, Chang BV, Liao CS, Tay JH. (2003). Using filtrate of waste biosolids to effectively produce bio-hydrogen by anaerobic fermentation. *Water Res*. 37(11):2789-2793
- Wang X, Zhao Y. (2009). A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. *Int J Hydrogen Energy*. 34:245-254
- Ward AJ, Hobbs PJ, Holliman PJ, Jones DL. (2008). Optimization of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresour Technol*. 99:7928-7940
- Weiland P. (2006). State of the art of solid-state-digestion recent developments. In: Rohstoffe, FN (Ed), Solid-state Digestion-state of the art and further R&D requirements. Vol. 24. Gulzower Fachgespräche, pp. 22-38
- Wilderer PA, Irvine RL, Goronszy MC. (2001). Sequencing Batch Reactor Technology. Scientific and Technical Report Series No. 10, *IWA Publishing*, London, 100 pp
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *PNAS*. 87:4576-4579
- Wüst PK, Horn MA, Drake HL. (2009). Trophic links between fermenters and methanogens in moderately acidic fen soil. *Environ Microbiol*. 11:1395-1409
- Ye NF, Lu F, Shao LM, Godon JJ, He PJ. (2007). Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes. *J Appl Microbiol*. 103 (4):1055-1065.
- Yoda M, Kitagawa M, Miyagi Y. (1987). Long term competition between sulfate-reducing and methane-producing bacteria for acetate in anaerobic biofilm. *Wat Res*. 21:1547-1556
- Yokoyama H, Moriya N, Ohmori H, Waki M, Ogino A, Tanaka Y. (2007). Community analysis of hydrogen-producing extreme thermophilic anaerobic microflora enriched from cow manure with five substrates. *Appl Microbiol Biotechnol*. 77(1):213-222
- Zhang T, Liu H, Fang HH. (2003). Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *J Environ Manage*. 69:149-156
- Zhang Y, Liu G, Shen J. (2005). Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentration. *Int J Hydrogen Energy*. 30:855-860
- Zhu H, Parker W, Conidi D, Basnar R, Seto P. (2011). Eliminating methanogenic activity in hydrogen reactor to improve biogas production in a two-stage anaerobic digestion process codigesting municipal food waste and sewage sludge. *Biores Technol*. 102:7086-92
- Zhu HG, Beland M. (2006). Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *Int J Hydrogen Energy*. 31:1980-1988
- Zinder SH, Anguish T, Cardwell SC. (1984). Selective inhibition by 2-bromoethanesulfonate of methanogenesis from acetate in a thermophilic anaerobic digester. *Appl Environ Microbiol*. 47:1343-1345
- Zuo J, Zuo Y, Zhang W, Chen J. (2005). Anaerobic bio-hydrogen production using pre-heated river sediments as seed sludge. *Water Sci Technol*. 52(10-11):31-39