



---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**UNIDAD DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**“EFECTO DE LA RELACIÓN SUSTRATO - INÓCULO Y  
ION FIERRO EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO  
DURANTE LA FERMENTACIÓN OSCURA.”**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**I.Q. ADELA MARTÍNEZ EPITACIO**

**EN OPCIÓN AL GRADO DE**

**MAESTRA EN INGENIERÍA**

**OPCIÓN AMBIENTAL**

**MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO.**

**2019**

Aunque este trabajo hubiere servido para el Examen de Grado y hubiere sido aprobado por el Sínodo, sólo el autor es responsable de las doctrinas emitidas en él.

# **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad Autónoma de Yucatán, por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis.

# RESUMEN

El hidrógeno ( $H_2$ ) comúnmente es generado por fuentes fósiles, principalmente por refinación del gas natural, por lo que una producción a través de fuentes renovables puede responder a una demanda de alternativas de explotación más amigables con el medio ambiente. Un medio para la producción de  $H_2$  de manera biológica es la fermentación oscura, la cual resulta ser una estrategia atractiva ya que se obtienen altas tasas de producción de hidrógeno, además de que si se utiliza materia orgánica de residuos como fuente de producción es posible obtener un producto con valor agregado a partir del tratamiento de un desecho. Sin embargo, varios factores pueden afectar de manera beneficiosa o perjudicial el proceso de producción de  $H_2$  durante la fermentación oscura.

En el presente trabajo de investigación se estudiaron dos factores, la adición de ion Fe en una solución de 75 mg/L y 150 mg/L de  $FeSO_4$  y la relación Sustrato-Inóculo inicial ( $S_0/X_0$ ) de 0.25:1, 0.5:1 y 1:1, usando como sustrato sacarosa y como inóculo el lodo anaerobio de una planta de tratamiento de aguas residuales domésticas de la ciudad de Mérida, Yucatán. Se obtuvo un rendimiento de 2.90 mol  $H_2$  / mol Sacarosa, así como los coeficientes cinéticos de la producción de hidrógeno donde la mayor producción fue en la relación de 0.25  $S_0/X_0$  teniendo un  $H_{max}$  de 299.29 mL, además en esta relación también se presentó la mayor tasa de producción de hidrógeno que fue de 36.79 mL/h.

# ABSTRACT

Hydrogen ( $H_2$ ) is commonly generated by fossil fuels, mainly by refining natural gas, so that production through renewable sources can respond to a demand for more environmentally friendly exploitation alternatives. One of the means to produce  $H_2$  in a biological way is dark fermentation, which turns out to be an attractive strategy since high rates of hydrogen production are obtained, in addition if organic waste material is used as a production source is possible to obtain a product with added value from the treatment of a waste. However, several factors can beneficial or detrimentally affect the  $H_2$  production process during dark fermentation.

In the present research two factors were studied, the addition of Fe ion in a 75 mg / L solution and 150 mg / L of  $FeSO_4$  and the initial Substrate-Inoculum ( $S_0/X_0$ ) ratio of 0.25: 1, 0.5: 1 and 1: 1, using sucrose as substrate and anaerobic sludge as inoculum from wastewater treatment plant in the city of Merida, Yucatan. The kinetic coefficients of hydrogen production were obtained, where the highest production was in the 0.25  $S_0 / X_0$  ratio, with a  $H_{max}$  of 299.29 mL, furthermore in this relation also was obtained the highest rate of biogas production with 36.79 mL / h.

# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Planteamiento del problema.....	1
1.2 Hipótesis .....	3
1.3 Objetivos .....	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
<b>CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>5</b>
2.1 Proceso anaerobio .....	7
2.2 Fermentación oscura.....	10
2.3 Parámetros que afectan la fermentación oscura .....	12
2.3.1 Inóculo .....	13
2.3.2 Temperatura .....	14
2.3.3 Pretratamiento .....	15
2.3.4 pH.....	15
2.3.5 Nutrientes .....	16
2.3.6 Sustrato .....	17
2.3.7 Relación Sustrato/Inóculo.....	18
<b>CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA .....</b>	<b>20</b>
3.1 Inóculo.....	21
3.2 Preparación de las unidades experimentales.....	21
3.3 Métodos analíticos .....	23
3.3.1 Cinéticas de producción de biogás e hidrógeno .....	23
3.3.2 Caracterización del contenido del reactor.....	24
3.3.2.1 Determinación de hidrógeno .....	24

3.3.2.2	Determinación de ácidos grasos volátiles .....	24
3.3.2.3	Cuantificación de la demanda química de oxígeno (DQO) .....	25
3.3.2.4	Cuantificación de carbohidratos .....	25
3.4	Diseño experimental.....	25
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>		<b>27</b>
4.1	Cinéticas de la producción de biogás.....	29
4.2	Cinéticas de producción de hidrógeno. ....	31
4.3	Producción de biogás.....	32
4.4	Producción de H <sub>2</sub> .....	34
4.5	Rendimiento de producción de H <sub>2</sub> .....	36
4.6	Producción de AGVs .....	38
4.6.1	Ácido acético .....	40
4.6.2	Ácido butírico .....	42
4.6.3	Ácido propanoico .....	44
4.7	DQO remanente .....	46
4.8	Carbohidratos remanentes.....	48
<b>CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES .....</b>		<b>51</b>
<b>CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES .....</b>		<b>52</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>		<b>53</b>

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Fuentes de producción de hidrógeno.....	5
<b>Tabla 2.</b> Reacciones acetogénicas. ....	9
<b>Tabla 3.</b> Nutrientes utilizados en la producción de hidrógeno.....	16
<b>Tabla 4.</b> Relación Sustrato-Inóculo. ....	19
<b>Tabla 5.</b> Análisis físico-químicos.....	23
<b>Tabla 6.</b> Diseño experimental .....	26
<b>Tabla 7.</b> Coeficientes cinéticos de la producción de biogás de acuerdo con el modelo de Gompertz.....	28
<b>Tabla 8.</b> Valores de P para las diferentes variables.....	29
<b>Tabla 9.</b> Coeficientes cinéticos de la producción de biogás de acuerdo con el modelo de Gompertz.....	30
<b>Tabla 10.</b> Coeficientes cinéticos de la producción de hidrógeno de acuerdo con el modelo de Gompertz. ....	32
<b>Tabla 11.</b> Análisis de varianza de dos factores para la variable biogás.....	32
<b>Tabla 12.</b> Análisis de varianza para la variable H <sub>2</sub> .....	34
<b>Tabla 13.</b> Análisis de varianza dos factores para el rendimiento mol H <sub>2</sub> / mol sacarosa .....	36
<b>Tabla 14.</b> Comparación de rendimientos de producción de H <sub>2</sub> .....	38
<b>Tabla 15.</b> Análisis de varianza de dos factores para la variable AGVs <sub>totales</sub> .....	39
<b>Tabla 16.</b> Análisis de varianza de dos factores para la variable ácido acético .....	41
<b>Tabla 17.</b> Análisis de varianza de dos factores para la variable ácido butírico .....	43
<b>Tabla 18.</b> Análisis de varianza de dos factores para la variable ácido propanoico. ..	44
<b>Tabla 19.</b> Análisis de varianza de dos factores para la variable DQO remanente ....	46
<b>Tabla 20.</b> Análisis de varianza de dos factores para la variable carbohidratos remanentes. ....	48



## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Producción de hidrógeno de manera biológica. ....	6
<b>Figura 2.</b> Etapas del proceso de digestión anaerobia.....	8
<b>Figura 3.</b> Ruta de producción de hidrógeno por fermentación de glucosa. ....	11
<b>Figura 4.</b> Mejoras en la producción de biohidrógeno.....	13
<b>Figura 5.</b> Esquema de la metodología.....	20
<b>Figura 6.</b> Montaje de la unidad experimental.....	22
<b>Figura 7.</b> Cinéticas de producción de biogás.....	27
<b>Figura 8.</b> Cinéticas de producción de biogás de acuerdo con $S_0/X_0$ y concentración de ion Fe. ....	30
<b>Figura 9.</b> Cinéticas de producción de hidrógeno. ....	31
<b>Figura 10.</b> Comparación múltiple de las medias de la producción de biogás de acuerdo con la relación $S_0/X_0$ .....	33
<b>Figura 11.</b> Comparación múltiple de las medias de la producción de biogás de acuerdo con la concentración de ion Fe.....	33
<b>Figura 12.</b> Comparación múltiple de las medias de la producción de $H_2$ de acuerdo con la relación $S_0/X_0$ .....	34
<b>Figura 13.</b> Comparación múltiple de las medias de la producción de $H_2$ de acuerdo con la concentración ion Fe.....	35
<b>Figura 14.</b> Comparación múltiple de las medias del rendimiento de acuerdo con la relación $S_0/X_0$ . ....	36
<b>Figura 15.</b> Comparación múltiple de las medias del rendimiento de acuerdo con la concentración de ion Fe. ....	37
<b>Figura 16.</b> Comparación múltiple de las medias de la producción de AGVs totales de acuerdo con la relación $S_0/X_0$ .....	39
<b>Figura 17.</b> Comparación múltiple de las medias de la producción de AGVs totales de acuerdo con la concentración de ion Fe.....	40
<b>Figura 18.</b> Comparación múltiple de las medias de la producción de ácido acético de acuerdo con la relación $S_0/X_0$ .....	41
<b>Figura 19.</b> Comparación múltiple de las medias de la producción de ácido acético de acuerdo con la concentración de ion Fe.....	42

<b>Figura 20.</b> Comparación múltiple de las medias de la producción de ácido butírico de acuerdo con la relación $S_0/X_0$ .....	43
<b>Figura 21.</b> Comparación múltiple de las medias de la producción de ácido butírico de acuerdo con la concentración de ion Fe.....	44
<b>Figura 22.</b> Comparación múltiple de las medias de la producción de ácido propanoico de acuerdo con la relación $S_0/X_0$ .....	45
<b>Figura 23.</b> Comparación múltiple de las medias del ácido propanoico de acuerdo con la concentración de ion Fe. ....	45
<b>Figura 24.</b> Comparación múltiple de las medias de DQO remanente de acuerdo con la relación $S_0/X_0$ . ....	47
<b>Figura 25.</b> Comparación múltiple de las medias de DQO remanente de acuerdo con la concentración de ion Fe. ....	47
<b>Figura 26.</b> Comparación múltiple de las medias de carbohidratos remanentes de acuerdo con la relación $S_0/X_0$ .....	49
<b>Figura 27.</b> Comparación múltiple de las medias de carbohidratos remanentes de acuerdo con la concentración de ion Fe.....	49

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Planteamiento del problema

La necesidad de mitigar el impacto al medio ambiente ha llevado a investigar nuevas fuentes de energías limpias, donde la producción de hidrógeno representa una gran alternativa, debido a que es un combustible limpio libre de carbono, donde el único subproducto final de su combustión es el agua. Además, puede ser útil para mitigar el calentamiento global y los problemas de contaminación al utilizar desechos orgánicos como sustrato para la producción de hidrógeno (Ghimere *et al.*,2015).

El hidrógeno ( $H_2$ ) comúnmente es generado por fuentes fósiles, principalmente por refinación del gas natural, por lo que una producción a través de fuentes renovables puede responder a una demanda de alternativas de explotación más amigables con el medio ambiente (Balat, 2008).

Entre los principales estudios de la producción de hidrógeno biológico se han enfocado en la biofotólisis del agua empleando algas y cianobacterias, así como en la fotofermentación de compuestos orgánicos por bacterias fotosintéticas y en la fermentación oscura de compuestos orgánicos ricos en carbohidratos mediante bacterias anaerobias.

Dentro de estas biotecnologías la fermentación oscura resulta ser una estrategia atractiva ya que se obtienen altas tasas de producción de gas hidrógeno comparado la biofotólisis y la fotofermentación, además de que si se utiliza materia orgánica de residuos como fuente de producción es posible obtener un producto con valor agregado a partir del tratamiento de un desecho.

Sin embargo, varios factores pueden limitar o en el caso contrario ayudar al proceso de producción de hidrógeno durante la fermentación oscura. Dentro de los factores que influyen en la fermentación oscura se encuentra el pH, que condiciones acidas

logra inhibir la actividad metanogénica o a los microorganismos consumidores de H<sub>2</sub> (Luo *et al.*, 2011), en cuanto al factor temperatura, se ha observado que rangos de 37-40 °C y 55-60 °C se logra una mejor producción de H<sub>2</sub> sin que se de inhibición (Elbeshbishy *et al.*, 2017).

En cuanto al factor nutrientes, necesarios para el metabolismo bacteriano, se ha reportado que el sodio, el magnesio, el zinc y el hierro son metales traza importantes que afectan la producción de hidrógeno (Blanco y Rodríguez, 2012; Lin y Lay, 2005). Entre ellos, el hierro es un nutriente importante para formar hidrogenasa u otras enzimas (Yang y Shen, 2006).

Finalmente, el factor relación sustrato- inóculo también influye, observándose que sustratos ricos en carbohidratos como glucosa, sacarosa y mezclas de almidones han sido ampliamente usados en la fermentación oscura.

De acuerdo con lo anterior, este estudio se centra en la evaluación de los parámetros de funcionamiento que afectan a la producción de hidrógeno durante la fermentación oscura, pretendiendo obtener un mayor entendimiento de las condiciones óptimas de operación lo que permitirá mejorar la eficiencia de dicho proceso.

## **1.2 Hipótesis**

La variación de los factores relación sustrato-inóculo y concentración ion Fe generará condiciones que permitan mejorar la producción de hidrógeno durante el proceso de fermentación oscura.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo general.**

Evaluar el efecto de los cambios de la relación de sustrato-inóculo ( $S_0/X_0$ ) y concentración de ion hierro en la producción de hidrógeno, mediante la fermentación oscura con un inóculo procedente de un digestor de tratamientos de aguas residuales.

### **1.3.2 Objetivos específicos.**

Comparar la producción de hidrógeno durante la fermentación oscura bajo diferentes condiciones de  $S_0/X_0$  y concentración de ion hierro.

Determinar la cinética de producción de  $H_2$  durante la fermentación oscura bajo las diferentes condiciones de estudio.

Analizar el efecto de las condiciones de  $S_0/X_0$  y concentraciones de ion hierro en los subproductos de la fermentación oscura.

## CAPÍTULO 2

### MARCO TEÓRICO

En los últimos años, los intereses de investigación y desarrollo se han dirigido hacia tecnologías que ayuden a mitigar el impacto ambiental. Entre las diversas fuentes de energía alternativa destaca la producción de hidrógeno ( $H_2$ ), considerado como uno de los combustibles preferenciales para el futuro, debido a su alta eficiencia energética, sin embargo, el principal desafío en el uso del hidrógeno radica en su producción (Tabla 1) y almacenamiento sostenible.

En aplicaciones comerciales, el hidrógeno se ha producido a partir de gas natural (48%) y petróleo (30%) mediante procesos de reformado con vapor, y también por otros métodos industriales como la gasificación de carbón (18%) y la electrólisis del agua (4%) (Balat, 2008).

**Tabla 1.** Fuentes de producción de hidrógeno.

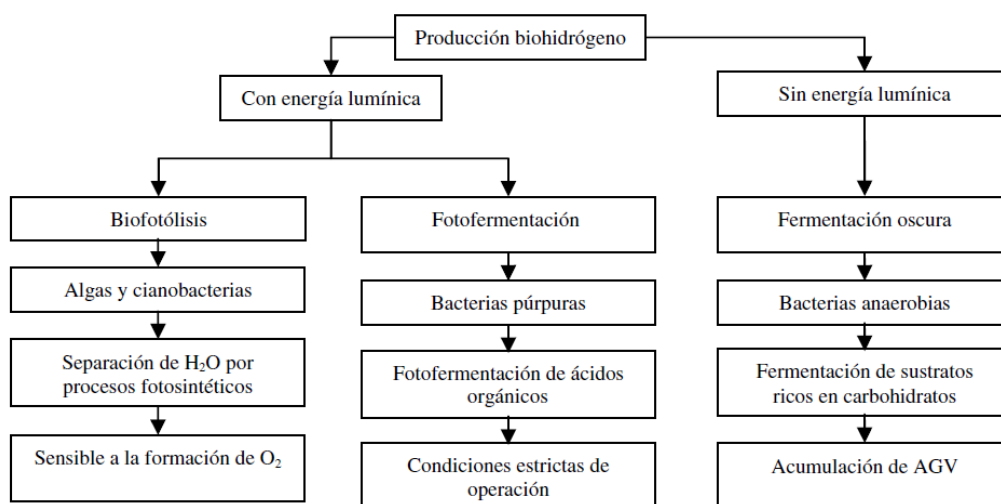
Método	Fuente		Descripción
	Energía primaria	Material	
Electrolisis	Eléctrica	Agua	La corriente continua se utiliza para separar el agua en $O_2$ y $H_2$ (reacción electroquímica)
Procesos Termoquímicos	División de agua		
Reformado de combustibles fósiles			Combustibles fósiles son convertidos en $CO_2$ y $H_2$
Gasificación de carbón			Conversión de carbón en gas de síntesis

Fuente: Dincer y Acar (2015)

Sin embargo, el hidrógeno puede ser producido a partir de procesos biológicos que requieren menos energía y sean más amigables con el medio ambiente en términos

de reducción global del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Estas tecnologías renovables que producen hidrógeno tienen el potencial de ser competitivas en cuanto a costos, ya que pueden usar biomasa residual como materia prima, tales como aguas y residuos orgánicos municipales, agrícolas e industriales, además de que el hidrógeno puede ser producido por microorganismos autótrofos y heterótrofos (Ghimere *et al.*,2015).

La producción biológica de hidrógeno está siendo objeto de una gran cantidad de investigaciones, proponiéndose diversos medios para su producción. Entre las diversas tecnologías se encuentran la fermentación oscura y la fotofermentación (Figura 1), que proporcionan una forma atractiva y ecológica de producción de hidrógeno a partir de fuentes renovables. La fotofermentación produce hidrógeno por microorganismos fotosintéticos utilizando moléculas de agua o ácidos simples como donantes de electrones, como algas, protistas y bacterias fotosintéticas, mientras que la fermentación oscura se lleva a cabo por microorganismos fermentadores que producen hidrógeno, como los anaerobios facultativos y los anaerobios obligados (Elbeshbishy *et al.*, 2017).



Fuente: (Blanco y Rodríguez, 2012).

**Figura 1.** Producción de hidrógeno de manera biológica.



En lo que respecta a la fermentación oscura, ésta ha ido ganando una mayor atención porque logra altas tasas de producción de hidrógeno, además de su capacidad de producir hidrógeno a bajo costo al degradar sustratos complejos de diferentes residuos (Marone *et al.*, 2017).

En los procesos de fermentación oscura, los sustratos ricos en carbohidratos se descomponen anaeróbicamente por microorganismos productores de hidrógeno, como los anaerobios facultativos y los anaerobios obligados (Ghimere *et al.*, 2015).

## **2.1 Proceso anaerobio**

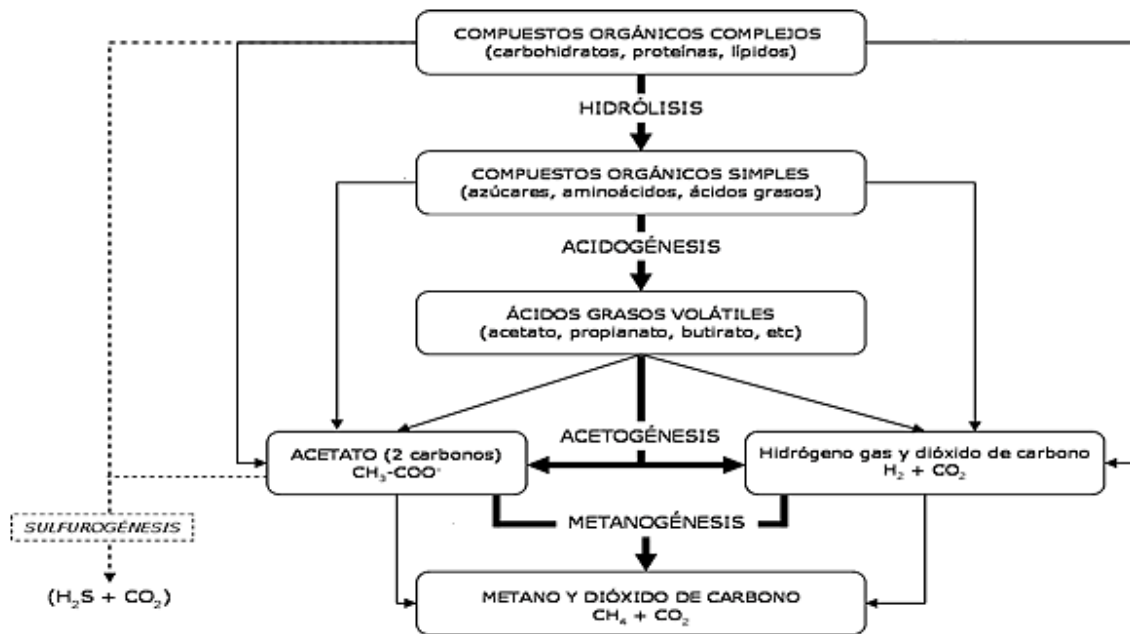
La digestión anaerobia es de gran interés, ya que ofrece la oportunidad de tratar los problemas relacionados con la gran cantidad de desechos orgánicos, al tiempo que disminuye al impacto ambiental ayudando al desarrollo de nuevas energías.

El proceso de digestión anaerobia se puede describir como una serie de reacciones bioquímicas mediante las cuales la materia orgánica se convierte en metano (CH<sub>4</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) mediado por microorganismos en ausencia de oxígeno (Adekunle *et al.*, 2015). El proceso anaerobio (Figura 2) consta de cuatro etapas, hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y finalmente la metanogénesis (Khan *et al.*, 2016a).

La etapa inicial de los procesos de digestión anaerobia es la hidrólisis, la cual implica la transformación de materiales orgánicos insolubles, donde los compuestos con mayor peso molecular como celulosa, polisacáridos, proteínas y grasas se convierten en aminoácidos, azúcares y ácidos grasos (Khan *et al.*, 2016b).

La velocidad de descomposición durante la hidrólisis depende de la naturaleza del sustrato, para llevar a cabo la biodegradación, ciertos microorganismos secretan diferentes tipos de enzimas, llamadas enzimas extracelulares que “cortan” a las moléculas grandes para que los microorganismos puedan utilizarlos como fuente de energía, algunas enzimas son por ejemplo la proteinasa, celulasa, hemicelulasa, lipasa y amilasa.

La acidogénesis es conocida como la etapa de producción de hidrógeno derivada de la digestión anaeróbica, es en esta fase donde los monómeros y los derivados solubles del componente orgánico en el sustrato se convierten en ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGV), hidrógeno, dióxido de carbono, alcoholes y acetatos (Kumaran *et al.*, 2016).



Fuente: (Gujer y Zehnder, 1983)

**Figura 2.** Etapas del proceso de digestión anaerobia.

La fermentación acidogénica podría clasificarse en tres tipos diferentes: La fermentación de tipo butírico donde se produce ácido butírico y ácido acético junto con CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>, la fermentación de tipo propiónico, la cual no implica una producción significativa de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> en la producción de ácido propiónico y ácido acético y finalmente, la fermentación de tipo etanol, ésta tiene importantes componentes de producción de etanol y ácido acético junto con pequeñas cantidades de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> (Kandylyis *et al.*, 2016).

En las etapas de la hidrólisis y la acidogénesis los productos iniciales no pueden ser consumidos directamente por los microorganismos metanogénicos, por lo cual la siguiente etapa, la acetogénesis es de suma importancia en la producción de hidrógeno.

En la acetogénesis se realiza la conversión bioquímica de los productos de la acidogénesis mediante dos mecanismos de reacción: la acetogénesis acetoclastica y la homoacetogenesis hidrogenotrófica. En el primer mecanismo algunos metabolitos como valerato, butirato y propianato producidos en las etapas anteriores se convierten en acetato e H<sub>2</sub> (Tabla 2) para que puedan ser aprovechados posteriormente por microorganismos metanogénicos. El segundo mecanismo se realiza la síntesis del acetato a través del consumo de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.

**Tabla 2.** Reacciones acetogénicas.

<b>Reacción de ácidos grasos</b>	<b>ΔG(kJ)</b>
Propionato+3 H <sub>2</sub> O →Acetato+HCO <sup>-3</sup> +H <sup>+</sup> +3 H <sub>2</sub>	+76.1
Butirato+2 H <sub>2</sub> O → 2 Acetato + H <sup>+</sup> +2 H <sub>2</sub>	+48.1
Valerato+3 H <sub>2</sub> O →3 Acetato + 2 H <sup>+</sup> +4 H <sub>2</sub>	+48.1

La etapa final de la digestión anaerobia implica la producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> realizador por *Archaeas* metanogénicas, además dos grupos diferentes de microorganismos operan durante esta etapa, el grupo acetotrófico de metanógenos que consume los acetatos y los convierte en CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, mientras que el grupo hidrogenotrófico convierte el H<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub> (Andre *et al.*, 2016). El grupo hidrogenotrófico de metanógenos consume el H<sub>2</sub> producido como un donador de electrones para la reducción de CO<sub>2</sub> (Sarmiento *et al.*, 2011). Durante la producción de biohidrógeno en procesos anaerobios, el grupo hidrogenotrófico de metanógenos actúa como el consumidor de H<sub>2</sub> en la etapa final. Se requiere que sus actividades sean suprimidas para asegurar la producción máxima de H<sub>2</sub> basada en el proceso anaerobio.

La etapa final de la digestión anaerobia implica la producción de biometano a partir de la reducción de  $\text{CO}_2$  utilizando  $\text{H}_2$  como donante de electrones. El  $\text{H}_2$  producido se consume a través del proceso conocido como metanogénesis hidrogenotrófica, que disminuye el rendimiento total de biohidrógeno. El  $\text{H}_2$  también es consumido por las bacterias productoras de alcohol, donde se consume como donador de electrones tanto en la molécula de las formas como en equivalentes de  $\text{H}_2$ . Durante la fermentación oscura, el lactato es degradado por productores de propionato como *Clostridium propionicum* y *Clostridium homopropionicum* a través del consumo de NADH (Khan *et al.*, 2017).

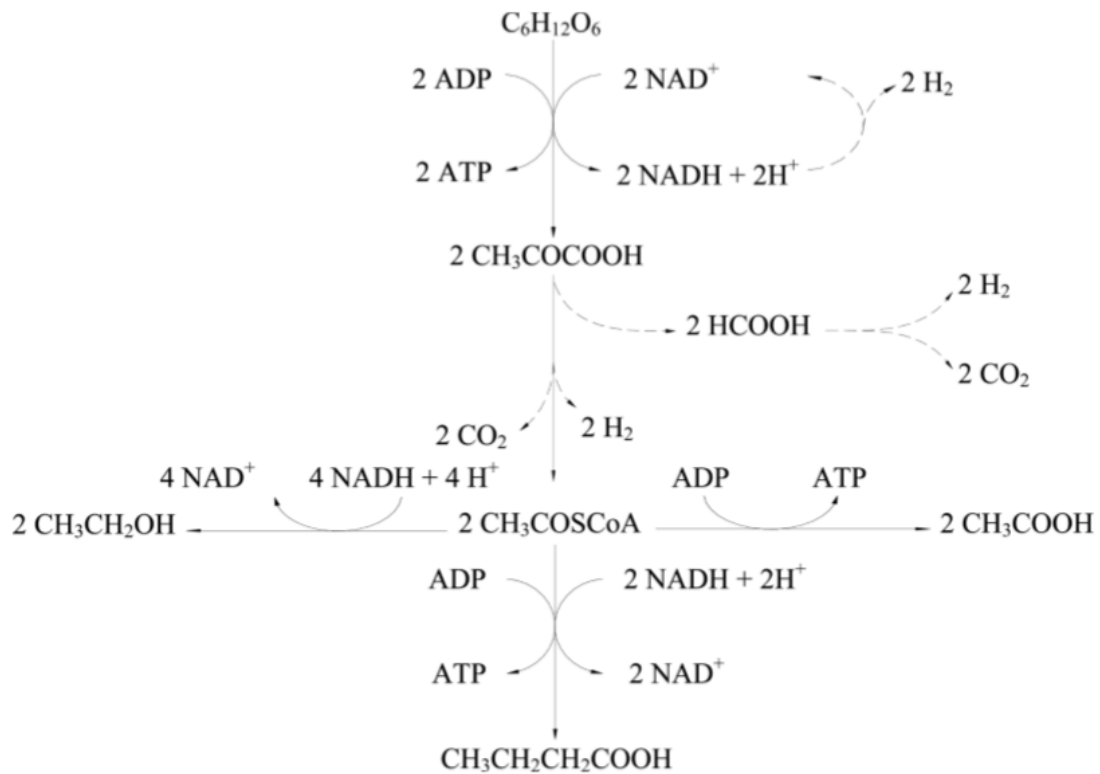
## 2.2 Fermentación oscura

En los procesos de fermentación oscura los sustratos ricos en carbohidratos se descomponen anaeróbicamente por microorganismos productores de  $\text{H}_2$ . El hidrógeno molecular ( $\text{H}_2$ ) se produce en el proceso de eliminación del exceso de electrones a través de la actividad de la enzima hidrogenasa.

En ambientes anaerobios, los protones ( $\text{H}^+$ ) pueden actuar como aceptores de electrones para neutralizar los electrones generados por la oxidación de sustratos orgánicos, produciendo hidrógeno (Ghimire *et al.*, 2015).

Este proceso tiene la ventaja de una alta tasa de producción de hidrógeno, una alta tasa de crecimiento celular y la utilización de formas complejas de sustrato orgánico como almidón, celulosa o desechos municipales. Los subproductos de la producción de  $\text{H}_2$  se componen principalmente de ácidos grasos volátiles (AGV) como el ácido acético, el ácido butírico y el ácido propiónico.

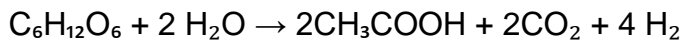
Muchas rutas han sido propuestas para la producción de hidrógeno. En la Figura 3 se muestra la ruta metabólica de la fermentación oscura usando glucosa como sustrato



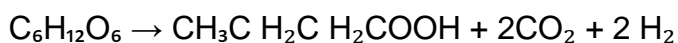
Fuente: (Li y Fang, 2007)

**Figura 3.** Ruta de producción de hidrógeno por fermentación de glucosa.

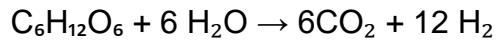
La producción de  $H_2$  depende de la vía en la que se lleve a cabo en la fermentación y de los productos finales. Cuando el ácido acético es el único producto final se obtiene un rendimiento teórico de 4 moles de  $H_2$  / mol glucosa, de acuerdo con la siguiente ecuación:



Cuando el butirato es generado se produce 2 moles de  $H_2$  / mol glucosa:

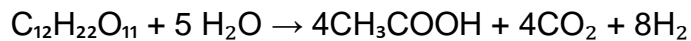


Teóricamente en la oxidación completa de glucosa a  $H_2$  y  $CO_2$  el máximo rendimiento que se podría obtener es de 12 moles de  $H_2$  / mol glucosa:

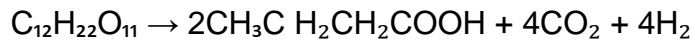


Sin embargo, la completa oxidación de glucosa a 12 moles de  $\text{H}_2$  aún no ha sido reportada, por lo tanto, el máximo rendimiento es considerado 4 moles de  $\text{H}_2$  / mol glucosa cuando el ácido acético es el único producto final (Dhar *et al.*, 2015).

Cuando la fuente de carbono es sacarosa y se produce ácido acético se da la siguiente reacción (Khanal, *et al.*, 2004), generando 8 moles de  $\text{H}_2$  / mol sacarosa:



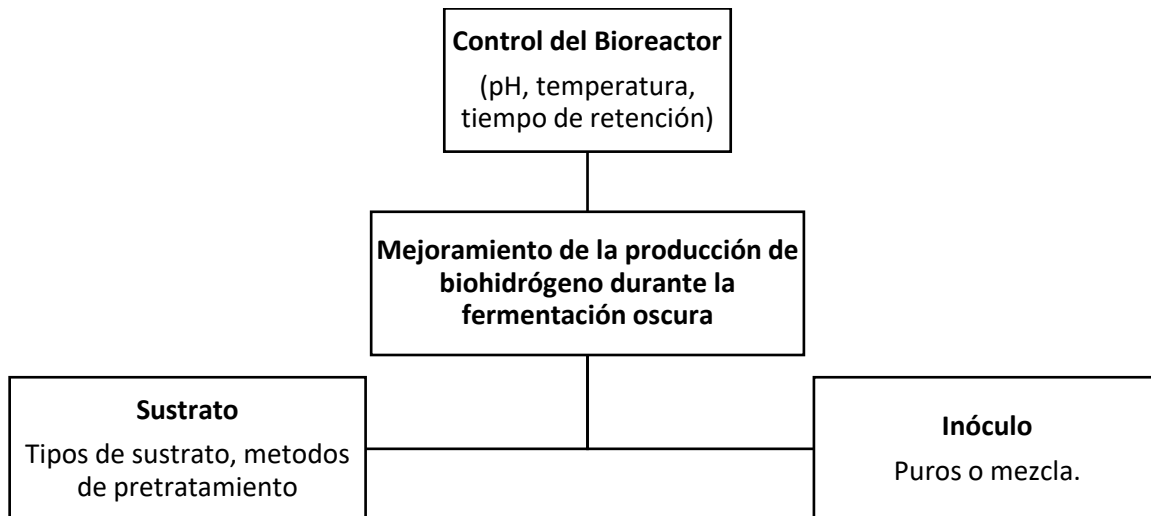
Cuando el ácido butírico es generado se produce 4 moles de  $\text{H}_2$  / mol sacarosa:



Estas rutas se han encontrado en aproximadamente el 50% en microorganismos del género *Clostridium*, otros productos pueden ser propionato, succinato y lactato.

### **2.3 Parámetros que afectan la fermentación oscura**

La producción de hidrógeno está siendo ampliamente estudiada debido a que es una fuente de energía prometedora, sin embargo, como se muestra en la Figura 4, algunos parámetros tales como la temperatura, pH, tipos de sustrato, fuente de inóculo influyen en la producción.



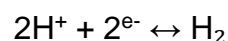
**Figura 4.** Mejoras en la producción de biohidrógeno.

### 2.3.1 Inóculo

El potencial uso de microorganismos para la producción de hidrógeno como futura fuente de energía hace que se abra un amplio campo de investigación sobre las rutas metabólicas de producción del hidrógeno.

Muchas bacterias fermentativas producen hidrógeno, como mecanismo específico para eliminar el exceso de electrones a través de la actividad de la hidrogenasa en bacterias. Las bacterias que poseen tal capacidad incluyen anaerobios estrictos (clostridios, metilótrofos, bacterias del rumen, bacterias metanogénicas, arqueas), anaerobios facultativos (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*) e incluso aerobios (*Alcaligenes*, *Bacillus*).

Hidrogenasas es el nombre que se les da a la familia de enzimas que catalizan la oxidación reversible del hidrógeno en sus constituyentes de partículas elementales, dos protones (H<sup>+</sup>) y dos electrones:



Estas pueden funcionar en cualquier dirección: algunas consumen H<sub>2</sub> (en presencia de electrones adecuados) o pueden producir H<sub>2</sub> (bajo anaerobiosis). En algunos

microorganismos, como las cianobacterias, capaces de cambiar entre un metabolismo aerobio y anaerobio, la llamada hidrogenasa bidireccional puede catalizar la captación o el consumo de H<sub>2</sub> según las condiciones ambientales (Vignais *et al.*, 2006).

La producción de hidrógeno se puede llevar a cabo tanto con cultivos puros como con cultivos mixtos, los cuales por lo general provienen de productos desechos. Aunque los cultivos puros han sido investigados en los últimos, entre ellos *Bacillus coagulans*, *Thermoanaerobacterium spp.*, *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum*, pocos son los estudios que se han hecho sobre la caracterización de cultivos mixtos. Una amplia gama de microorganismos ha sido usada como inóculos para la producción de hidrogeno, incluidos lodos anaerobios de plantas de tratamiento de aguas residuales, residuos de ganado, lixiviados de vertederos, entre otros, demostrándose que el origen del inóculo afecta el rendimiento del biorreactor (Guo *et al.*, 2010).

### **2.3.2 Temperatura**

El rendimiento del hidrógeno depende de la temperatura ya que esta afecta la velocidad a la que se lleva la hidrólisis, en la actividad de las enzimas y microorganismos productores de H<sub>2</sub>, así como en la degradación del sustrato.

La fermentación oscura se puede llevar a cabo a diferentes temperaturas que van desde mesofílicas (25-40 °C), termófilas (40-65 °C), termófilas extremas (65-80 °C) o hipertermófilas (> 80 °C). La temperatura a la cual debe de operar el proceso puede cambiar a medida que diferentes microorganismos se vuelvan predominantes, aunque se ha encontrado un amplio rango de temperaturas (30-60 °C) óptimo para la fermentación oscura, la mayoría de los estudios sugirieron la temperatura de funcionamiento óptima para la fermentación oscura entre 37-40 °C y 55-60 °C para lograr una mejor producción del hidrógeno sin ninguna inhibición (Elbeshbishy *et al.*, 2017). Existen residuos tales como los agrícolas que requieren de altas temperaturas para lograr un mayor rendimiento de hidrógeno debido a los compuestos lignocelulósicos presentes (Guo *et al.*, 2010), sin embargo, el mantener altas temperatura puede incrementar los costos de producción, por otra parte, existen



sustratos que son fácilmente degradables que son favorecidos con temperaturas mesófilas.

### **2.3.3 Pretratamiento**

El efecto de la temperatura en la producción de hidrógeno también se puede observar cuando se emplea como un pretratamiento en cultivos mixtos ya que resulta muy efectivo en la inhibición de microorganismos como *Archeas* metanogénicas, favoreciendo a las bacterias productoras de H<sub>2</sub> que pudieran estar en el inóculo.

El método más utilizado de pre-tratamiento es un “choque térmico” aplicado a diferentes temperaturas (80 -100°C) a diferentes tiempos, con la finalidad de inhibir a los microorganismos consumidores de H<sub>2</sub>, Sin embargo, las bacterias homoacetogénicas formadoras de esporas pueden permanecer en el cultivo durante cortos períodos de tratamiento térmico las cuales consumen H<sub>2</sub> para la producción de ácido acético. Por lo tanto, aumentar la duración del choque térmico puede ser útil para eliminar los consumidores de H<sub>2</sub> (Argun y Kargi, 2009).

### **2.3.4 pH**

El pH es uno de los parámetros de funcionamiento más críticos ya que éste determina las vías metabólicas óptimas para la producción de H<sub>2</sub>. La ruta metabólica y la velocidad de crecimiento de los microorganismos se definen por el pH de un reactor durante la producción de H<sub>2</sub>. Cualquier cambio en la concentración de iones de hidrógeno da como resultado un cambio en el pH y finalmente conduce a un cambio en el potencial redox. Esta serie de eventos puede desencadenar un cambio en la tasa de recepción de electrones por los protones y, finalmente, la tasa de producción de H<sub>2</sub>.

Dentro de los rangos que pueden favorecer la producción se reportan de 5.5-6.8 por Liu *et al.*, (2011). En condiciones mesófilas y termófilas un pH ácido (menor de 6) inhibe principalmente la actividad metanogénica, pero la inhibición de la actividad

homoacetogénica la cual consume el H<sub>2</sub> se logra en condiciones termófilas a un pH inicial de 5.5 (Luo *et al.*, 2011)

El pH óptimo para la producción de hidrógeno puede variar entre un rango de 4.5 a 9 (Khanal *et al.*, 2003, Lee *et al.*, 2002) en fermentación oscura de sacarosa, lo que nos indica que el pH dependerá de los diferentes inóculos y tipos de sustratos que se empleen.

### 2.3.5 Nutrientes

La producción de biohidrógeno requiere ciertos micronutrientes esenciales para el metabolismo, el crecimiento y la actividad de los microorganismos. Se han utilizado muchas formulaciones con nutrientes diferentes teniendo una eficacia de producción diversa.

Se ha reportado que el nitrógeno, los fosfatos y algunos iones metálicos son nutrientes importantes para el crecimiento celular de microorganismo productores de hidrógeno (Blanco y Rodríguez, 2012).

Lin y Lay (2005) realizaron un estudio donde indicaron que los nutrientes tienen un efecto significativo en la estabilidad del hidrógeno en la microflora de los lodos de agua residual donde el magnesio, sodio, zinc y hierro fueron los nutrientes importantes, ya que estos elementos se relacionan con el cofactor enzimático bacteriano y los procesos de transporte. En cuanto al ion hierro, es un nutriente importante para formar hidrogenasa u otras enzimas, Junelles *et al.*, (1988) observaron que la concentración limitada de ion hierro causaba una disminución en la actividad de la enzima hidrogenasa.

En la Tabla 3 se muestran algunos nutrientes utilizados en diferentes estudios.

**Tabla 3.** Nutrientes utilizados en la producción de hidrógeno.

Nutriente	Concentración mg/L	Sustrato	Temp. °C	pH	Inóculo	Referencia
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0 – 1000					
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0 – 1000	Glucosa	30	7	<i>C.acetobutylicum</i>	

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0 – 500					Alshiyab <i>et al.</i> , 2008
FeSO <sub>4</sub>	0 – 4000	Almidón soluble	35	8-7	Mezcla de Bacterias anaerobias	Yang y Shen, 2006
FeCl <sub>2</sub>	0-4000	sacarosa	37	6	Microorganismos mixtos de un silo de harina de soja	Lee <i>et al.</i> , 2001
Na <sup>+</sup>	0-1600	sacarosa	37	6.5	Lodos anaerobios	Hao <i>et al.</i> , 2006

### 2.3.6 Sustrato

Así como en el caso del pH y temperatura, el sustrato juega un papel importante en el rendimiento del hidrógeno, siendo los sustratos ricos en carbohidratos ampliamente usados en la fermentación oscura, particularmente glucosa, sacarosa y mezclas de almidones.

La composición del sustrato es muy importante para los microorganismos por lo tanto también influye en la estabilidad y producción del biogás. Entre los diversos sustratos ricos en materia orgánica, las aguas residuales y los subproductos industriales han ganado una atención considerable debido a sus ventajas tales como altas cargas orgánicas, bajos requerimientos de nutrientes y ganancia neta de energía positiva.

En particular, las aguas residuales representan fuentes abundantes y ampliamente disponibles de sustratos biodegradables aún no explotados para producir hidrógeno por fermentación oscura.

El uso de consorcios mixtos como biocatalizador para la producción de hidrógeno puede ser una opción práctica y prometedora para ampliar la tecnología de la fermentación oscura, especialmente cuando se utilizan aguas residuales como sustratos. Sin embargo, la cantidad de inóculo debe ajustarse, por lo que la cantidad de sustrato por inóculo ( $S_0/X_0$ ) es un parámetro de operación importante que afecta la vía microbiana (Liu, 1996). Entre los microorganismos que se han reportado como productores de hidrógeno se encuentran las bacterias acidogénicas como

*Enterobacter*, *Bacillus* y *Clostridium*, sin embargo, el uso de cultivos puros no resulta económico además de requerir estrictas condiciones de operación, por lo que el uso de un consorcio microbiano mixto ofrece ventajas como la capacidad de usar diferentes sustratos y por lo tanto un mejor rendimiento (Chaganti *et al.*, 2012).

### **2.3.7 Relación Sustrato/Inóculo**

La relación de sustrato – inóculo inicial ( $S_0/X_0$ ) afecta la vía microbiana que se llevará a cabo (Ghimire *et al.*, 2016). La concentración de sustrato inicial ( $S_0$ ) representa una fuente de carbono y energía para los requisitos de biosíntesis y otros propósitos energéticos, mientras que la concentración de biomasa inicial ( $X_0$ ) es una fuente de utilización del sustrato. Debe tenerse en cuenta que la relación  $S_0/X_0$  refleja el nivel de energía inicial en un cultivo en lotes, esta relación afectará directamente los patrones de crecimiento de los microorganismos, el aumento de las concentraciones de sustrato dentro de un rango óptimo generalmente mejora la producción de hidrógeno durante la fermentación oscura. Sin embargo, las altas concentraciones de sustrato pueden ser desfavorables para la producción de  $H_2$ , ya que la actividad de los microorganismos productores de hidrógeno puede inhibirse de varias maneras, incluida la acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV), pH intracelular inferior y alta presión parcial de hidrógeno (Elbeshbishy *et al.*, 2017). Por lo tanto, la optimización de la concentración del sustrato o de la relación entre alimentos y microorganismos y la velocidad de carga orgánica es fundamental para evitar la inhibición.

La producción de hidrógeno en diversas relaciones  $S_0/X_0$  de diferentes sustratos se han reportado como se muestra en la Tabla 4, tal es el caso de Dhar *et al.*, (2015) en donde evaluaron la producción de hidrógeno a diferentes ratios de  $S_0/X_0$  que fueron de 1, 2,4, 6 y 8 durante el proceso de fermentación oscura. Por otra parte, Aminnejad (2017) realizó una comparación de la relación inicial de  $S_0/X_0$  de 0.5 y 1 utilizando lodo de un digestor anaerobio, donde encontró que el rango óptimo en la producción de hidrógeno fue de 0.5  $S_0/X_0$ .

**Tabla 4.** Relación Sustrato-Inóculo.

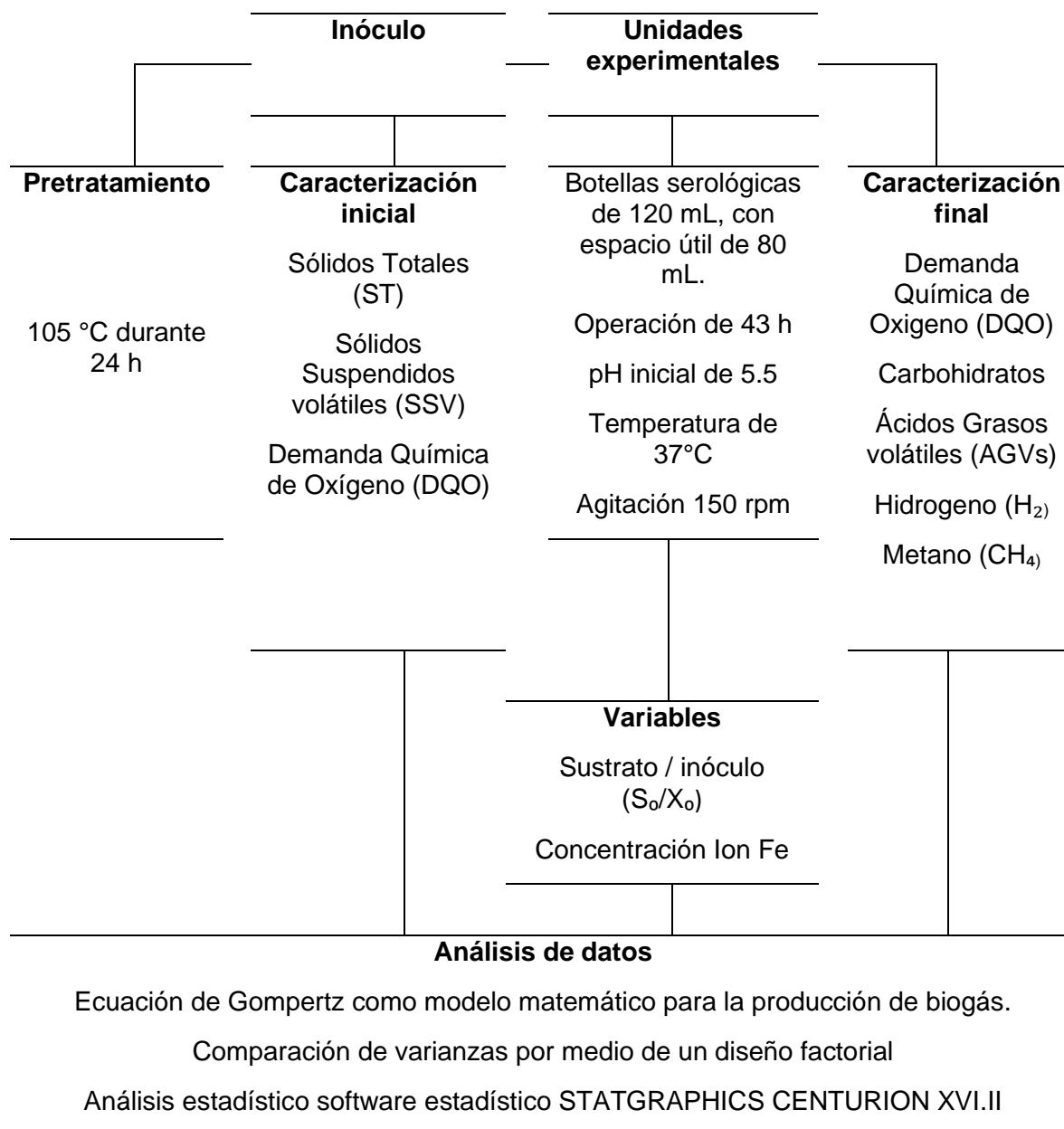
<b>Inóculo</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Relación <math>S_0/X_0</math></b>	<b>Referencia</b>
Lodos de digestor anaerobio	Jugo de remolacha azucarera	1,2,4,6 y 8	Dhar <i>et al.</i> , 2015
Lodos de digestor anaerobio	Desechos de papa	0.5 y 1	Aminnejad, M., (2017).
Cultivo mixto de composta	Residuos cerveceros	0.4 -6.4	Fan y Chen, 2004

De acuerdo con lo anterior, la fermentación oscura para la producción de hidrógeno es una biotecnología atractiva que puede proporcionar diversos beneficios en términos de renovabilidad y neutralidad de carbono. Sin embargo, el control de los diversos parámetros de operación es muy importante ya de estos dependerá el buen funcionamiento, así como el rendimiento de la producción de hidrógeno.

# CAPÍTULO 3

## METODOLOGÍA

En la Figura 5 se muestra un esquema general de la metodología que se llevó acabo:



**Figura 5.** Esquema de la metodología.

### 3.1 Inóculo

El inóculo utilizado fue una muestra de lodo contenido de un digestor anaerobio de tratamiento de aguas residuales municipales de la ciudad de Mérida, Yucatán, al cual se le realizó una caracterización inicial de sólidos totales (ST) (Horno Terlab TE-H35D), sólidos suspendidos volátiles (SSV) (Furnance 6000 Barnstead Thermolyne) así como la demanda química de oxígeno (DQO) conforme a los métodos APHA-AWWA-WPC (2012).

El lodo recibió un pretratamiento térmico en la estufa de 105 °C durante 24 h para inhibir a los microorganismos metanógenos y favorecer a los productores de hidrógeno (Moreno *et al.*, 2015). Después del pretratamiento, el lodo fue pulverizado con un mortero y almacenado hasta su uso, para posteriormente colocarlo en las unidades experimentales con las diferentes relaciones de sustrato-inóculo inicial ( $S_0/X_0$ ).

### 3.2 Preparación de las unidades experimentales

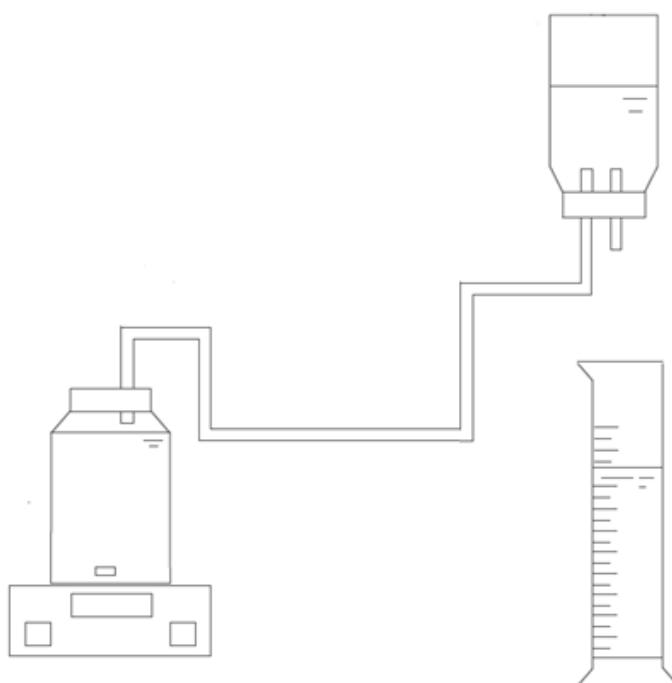
Cada unidad experimental constó de una botella de vidrio de 120 mL de capacidad, sellada con una tapa de goma y aro metálico, utilizando un volumen útil total de 80 mL dejando un espacio de cabeza de 40 mL.

A cada botella se le añadió una solución de nutrientes apropiada para el desarrollo del inóculo seleccionado que llevará a cabo el proceso, la cual fue una solución mineral consistente en 2 g/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 1 g/L  $\text{K H}_2\text{PO}_4$ , 100 mg/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 10 mg/L  $\text{NaCl}$ , 10 mg/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 15 mg/L  $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , además se adicionó una solución de  $\text{FeSO}_4$  en diferentes concentraciones (75 y 150 mg/L), contando con un blanco, es decir un tratamiento sin adición de  $\text{FeSO}_4$  (Alshiyab *et al.*, 2008, Yang y Shen, 2006).

Como fuente de carbono se utilizó sacarosa, en una relación de sustrato - inóculo inicial ( $S_0/X_0$ ) de 0.25:1, 0.50:1 y 1:1, en base al contenido de los SSV del inóculo pretratado, para llegar a un volumen de 80 mL adicionando agua destilada, ajustando el pH a 5.5

con una solución de HCl. Finalmente, cada reactor en ausencia de luz fue incubado a 37°C con una agitación de 150 rpm, como se muestra en la Figura 6.

La cantidad de biogás que se produjo fue medida por el método de desplazamiento de líquido, el cual está compuesto por una botella invertida con una solución barrera saturada de NaCl (30 g / 100 mL de agua destilada) acidificada a un pH<2. y una probeta para la recolección del agua desplazada.



**Figura 6.** Montaje de la unidad experimental



### 3.3 Métodos analíticos

En la Tabla 5 se muestran los parámetros medidos:

**Tabla 5.** Análisis físico-químicos.

Parámetro	Método de análisis
pH	Potenciómetro
T (°C)	Termómetro
DQO (mg/L)	APHA-AWWA-WPCF Standars Methods (2012)
ST (mg/L)	APHA-AWWA-WPCF Standars Methods (2012)
SSV (mg/L)	APHA-AWWA-WPCF Standars Methods (2012)
AGVs	Cromatografía de gases
H <sub>2</sub>	Cromatografía de gases
CH <sub>4</sub>	Cromatografía de gases
Carbohidratos	Método de Albalashmeh <i>et al.</i> (2013)

#### 3.3.1 Cinéticas de producción de biogás e hidrógeno

El biogás producido fue almacenado en la botella invertida descrita anteriormente. La determinación de H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en el biogás se llevó a cabo usando cromatografía de gases. Se hizo uso de la ecuación de Gompertz como modelo matemático para ajustar los datos de la curva de producción de biogás e hidrógeno en función del tiempo. Esta ecuación se ha empleado para el proceso de la fermentación oscura por lotes y permite de sacar parámetros de la cinética de producción de hidrógeno (Alexandropoulou *et al.*, 2018; Gadhamshetty *et al.*, 2009; Morales *et al.*, 2015).

$$H(t) = H_{max} \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{2.71828 * R_{max}}{H_{max}} * (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

Donde:

H(t) (mL) es el volumen total de hidrógeno acumulado en el tiempo t(h).

$H_{\max}$  (mL) es el máximo volumen de hidrógeno acumulado.

$R_{\max}$  (ml/h) es la máxima tasa de producción de hidrógeno.

$\lambda$ (h) es el tiempo de fase de latencia.

### **3.3.2 Caracterización del contenido del reactor**

Al finalizar la operación de los reactores a las 43 h, se tomaron lecturas de pH con ayuda del potenciómetro (pH/ Conductivity Thermo Orion 550A) y se realizaron los siguientes análisis:

#### **3.3.2.1 Determinación de hidrógeno**

El análisis del hidrógeno fue llevado a cabo en un cromatógrafo de gases (SRI 8610c) equipado con un detector de conductividad térmica, columna de acero inoxidable empacada con sílica gel (8600-PK1A), empleando helio (He) como gas de arrastre con flujo de 27 mL/min. Inyección de 0.5 ml de biogás a las siguientes condiciones: 1 min a 50 °C, incremento 50 °C/min hasta 100 °C y manteniéndola por 1 min. La temperatura del detector fue de 150 °C.

#### **3.3.2.2 Determinación de ácidos grasos volátiles**

Para el análisis de ácidos grasos volátiles (AGV), se colocó en un vial de 10 mL una alícuota de 2 mL del contenido del reactor (previamente acidificada a un  $\text{pH} < 2$  con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 3%), al cual se le añadieron 1 g de NaCl, 70  $\mu\text{L}$  de ácido isopropílico, 100  $\mu\text{L}$  de ácido heptanoico y 200  $\mu\text{L}$  de HCl 2M.

La cuantificación de AGV se realizó mediante un cromatógrafo de gases (Thermo Scientific - Trace GC Ultra ITQ 900) con una columna Innowax (30 m x 0.25 ID x 0.25  $\mu\text{m}$ ), equipado con un FID y una jeringa de inyección automática de 1000  $\mu\text{L}$ .

Las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura del puerto de inyección, 250°C; volumen inyección, 10  $\mu\text{L}$ ; flujo "split" 50 mL/min; modalidad

automática de inyección; detector de temperatura, 280 °C; He como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min; gas H<sub>2</sub> con un flujo de 35 mL/min; flujo de aire, 350 mL/min; N<sub>2</sub> como gas portador con flujo de 25 mL/min. El equipo fue programado para calentar el horno a 50 °C (1 min), de 50-140 °C a 10 °C/min, 140 °C por un 1 min, 140-220 °C a 30 °C/min, y 220 °C por 1 min.

### **3.3.2.3 Cuantificación de la demanda química de oxígeno (DQO)**

Para cuantificación de DQO se empleó el método de APHA-AWWA-WPCF Standards Methods (2012), donde fue necesario hacer una dilución 1:40 del contenido del reactor, haciendo uso del espectrofotómetro (Hach DR 2800) a una longitud de onda de 600 nm.

### **3.3.2.4 Cuantificación de carbohidratos.**

La cuantificación de carbohidratos se llevó a cabo por el método de Albalashmeh *et al.*, (2013), añadiendo 1 mL del contenido del reactor a diferentes diluciones previamente filtrado en un tubo de digestión de 10 mL, posteriormente se agregó 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, para mezclarlo en vortex durante 30s (Vortex-Genie 2 G 560) e inmediatamente se colocó en agua fría durante dos minutos para finalmente leer la absorbancia en el espectrofotómetro (UV-visible ChemStation Software) a una longitud de onda de 315 nm.

## **3.4 Diseño experimental**

El diseño fue análisis factorial 3<sup>2</sup>. El primer factor fue relación sustrato-inóculo con niveles de 0.25, 0.50 y 1 g DQO<sub>sustrato</sub>/g SSV; el segundo factor fue concentración de FeSO<sub>4</sub> de 0, 75 y 150 mg/L. En la Tabla 6 se muestra la configuración del sistema, cada combinación de las variables de estudio se hizo por triplicado.

**Tabla 6.** Diseño experimental

<b>Relación S/X</b>	<b>Concentración de FeSO<sub>4</sub> (mg/L)</b>	<b>0</b>	<b>75</b>	<b>150</b>
	<b>0.25</b>		0.25 S/X	0.25 S/X
<b>0.5</b>		0 mg/L	75 mg/L	150 mg/L
		0.5 S/X	0.5 S/X	0.5 S/X
<b>1</b>		0 mg/L	75 mg/L	150 mg/L
		1 S/X	1 S/X	1 S/X
		0 mg/L	75 mg/L	150 mg/L

Fueron 9 tratamientos, en el que cada tratamiento contó con tres replicas, teniendo un total de 27 unidades experimentales.

Los datos fueron analizados por comparación de varianzas (ANOVA), para saber si existe diferencia significativa por efecto de la relación sustrato-inóculo y concentración de nutriente. El análisis estadístico se llevó acabo con el software estadístico STATGRAPHICS CENTURION XVI.II.

# CAPÍTULO 4

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

A continuación (Figura 7), se muestran las nueve cinéticas de producción de biogás de los diferentes tratamientos que se llevaron a cabo de acuerdo con la Tabla 6.

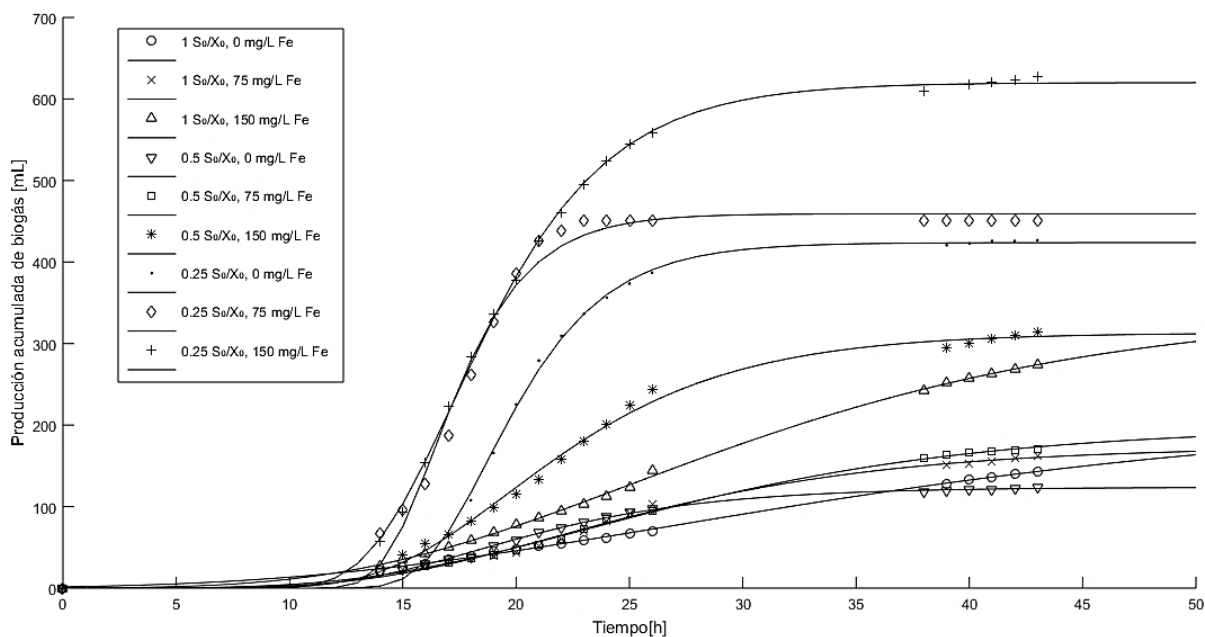


Figura 7. Cinéticas de producción de biogás.

Con ayuda del programa MATLAB R2015a y de acuerdo con el modelo de Gompertz se obtuvieron los coeficientes cinéticos de la producción de biogás, como se muestra en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Coeficientes cinéticos de la producción de biogás de acuerdo con el modelo de Gompertz

<b>Tratamientos</b>	<b>H<sub>max</sub> (mL)</b>	<b>R<sub>max</sub> (mL/h)</b>	<b>λ (h)</b>
1 S <sub>o</sub> /X <sub>o</sub> , 0 mg/L Fe	212.86	4.61	10.29
1 S <sub>o</sub> /X <sub>o</sub> , 75 mg/L Fe	173.62	7.63	13.47
1 S <sub>o</sub> /X <sub>o</sub> , 150 mg/L Fe	343.30	10.44	12.86
0.5 S <sub>o</sub> /X <sub>o</sub> , 0 mg/L Fe	123.71	8.01	12.48
0.5 S <sub>o</sub> /X <sub>o</sub> , 75 mg/L Fe	198.45	7.36	13.30
0.5 S <sub>o</sub> /X <sub>o</sub> , 150 mg/L Fe	313.20	20.79	14.06
0.25 S <sub>o</sub> /X <sub>o</sub> , 0 mg/L Fe	423.83	53.76	15.83
0.25 S <sub>o</sub> /X <sub>o</sub> , 75 mg/L Fe	456.17	72.53	14.04
0.25 S <sub>o</sub> /X <sub>o</sub> , 150 mg/L Fe	620.13	59.79	13.41

En la Tabla 7 se puede observar que la mayor producción de biogás acumulado se obtuvo en la relación de 0.25 S<sub>o</sub>/X<sub>o</sub>, en el que la adicción del ion Fe mejoró la producción de biogás dentro de esta relación de S<sub>o</sub>/X<sub>o</sub>. En las relaciones de 1 y 0.5 S<sub>o</sub>/X<sub>o</sub> el volumen más alto fue con la concentración de 150 mg/L de ion Fe.

Para saber si los dos factores, la relación S<sub>o</sub>/X<sub>o</sub> y el ion Fe, así como su interacción tenían algún efecto en las variables de estudio se prosiguió a realizar un análisis estadístico con ayuda de STATGRAPHICS CENTURION XVI.II., donde se obtuvo el valor de *P* (Tabla 8) de cada uno, el cual indica el grado de significancia de los factores S<sub>o</sub>/X<sub>o</sub> y ion Fe, así como la interacción entre ambos factores.

**Tabla 8.** Valores de  $P$  para las diferentes variables.

Variables	Valor de $P$ con $\alpha = 0.05$		
	S/X	Ion Fe	Interacción
Biogás (mL)	0.0001	0.0205	0.9857
H <sub>2</sub> (mL)	0.0000	0.0658	0.8538
Rend. mol H <sub>2</sub> / mol Sacarosa	0.0001	0.0655	0.8561
AGV <sub>totales</sub> (mg/L)	0.0069	0.0000	0.1503
Ác. Acético (mg/L)	0.4234	0.0000	0.0094
Ác. Propanoico (mg/L)	0.0096	0.0024	0.1112
Ác. Butírico (mg/L)	0.0103	0.0000	0.1218
DQO <sub>rem</sub> (mg/L)	0.0000	0.1181	0.9876
Carbohidratos <sub>rem</sub> (mg/L)	0.0000	0.0298	0.1774

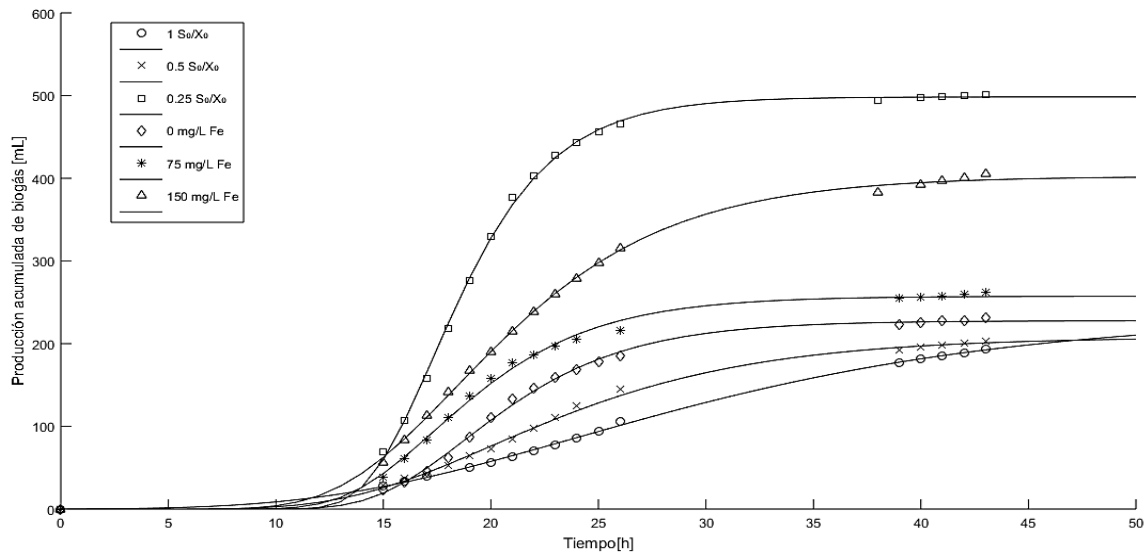
De acuerdo con la Tabla 8 ambos factores  $S_0/X_0$  y ion Fe presentan un valor de  $P$  menor de 0.05, por lo que al menos un factor tiene un efecto significativo en las variables. La interacción entre los factores no resultó significativa para ninguna de las variables, por lo que se procedió a realizar un análisis sin interacción de cada factor con sus diferentes niveles.

#### 4.1 Cinéticas de la producción de biogás

De acuerdo con la ecuación de Gompertz, se muestran los resultados de las cinéticas de biogás producidos de ambos factores, la relación  $S_0/X_0$  y concentración de ion Fe, en los diferentes niveles que se llevaron a cabo:

En la Figura 8, se puede observar que la fase de crecimiento exponencial se presentó entre las 15 y 25 h, mientras que en la Tabla 9 los máximos volúmenes de biogás acumulados y máxima tasa de producción se presentaron en la concentración de 150 mg/L de Fe y en la relación de 0.25  $S_0/X_0$  teniendo el doble de producción que en las relaciones de 1 y 0.5  $S_0/X_0$ .

De acuerdo la Tabla 9, se presentó un aumento en las tasas de producción de biogás en ambos factores, además se pudo observar que el incremento de la concentración de ion Fe no inhibió la actividad de los microorganismos para la producción de biogás.



**Figura 8.** Cinéticas de producción de biogás de acuerdo con  $S_0/X_0$  y concentración de ion Fe.

**Tabla 9.** Coeficientes cinéticos de la producción de biogás de acuerdo con el modelo de Gompertz.

Tratamientos	$H_{max}$ (mL)	$R_{max}$ (mL/h)	$\lambda$ (h)
1 $S_0/X_0$	234.28	7.37	12.27
0.5 $S_0/X_0$	208.02	11.22	13.22
0.25 $S_0/X_0$	498.25	59.45	14.23
0 mg/L Fe	227.74	19.94	14.60
75 mg/L Fe	257.35	23.15	13.29
150 mg/L Fe	402.51	26.97	12.92

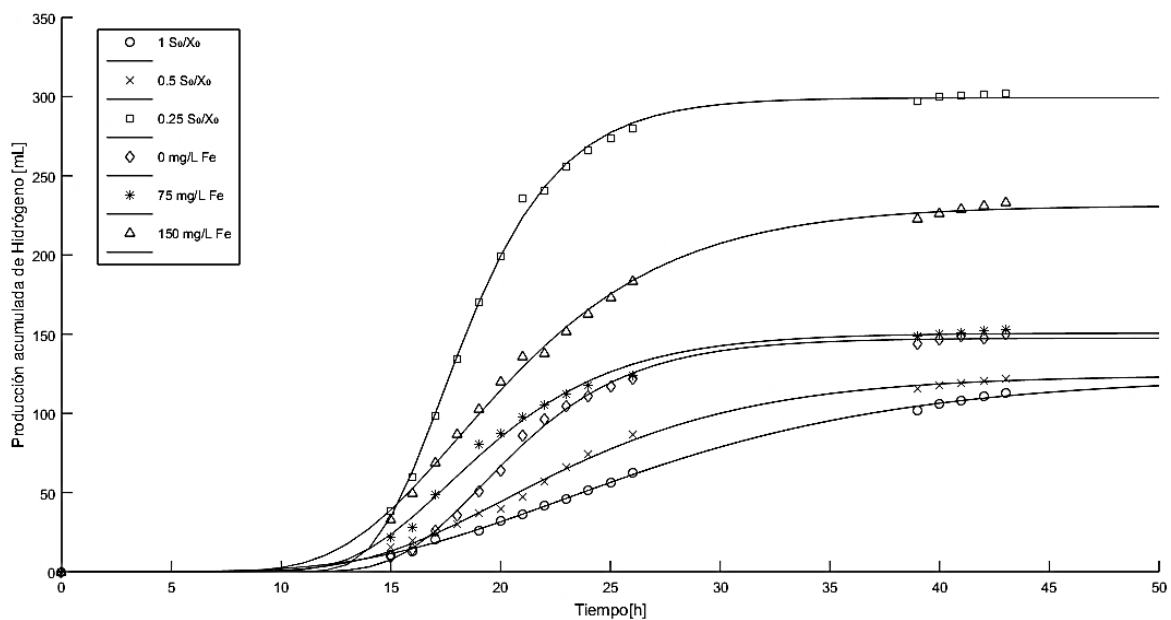
$H_{max}$  : máximo volumen de biogás acumulado,  $R_{max}$  : máxima tasa de producción de biogás,  $\lambda$  : tiempo de fase de latencia.



En el caso de la fase de latencia esta aumentó en las relaciones de 0.5 y 0.25  $S_0/X_0$ , caso contrario en la concentración de ion Fe, mientras éste incrementaba la fase latencia disminuía.

## 4.2 Cinéticas de producción de hidrógeno.

El biogás producido en las cinéticas fue analizado en el cromatógrafo de gases para determinar el porcentaje de  $H_2$  presente, teniendo un máximo de 68%. Cabe destacar que no se encontró  $CH_4$  lo que se podría atribuir al efecto del pretratamiento el cual ayudo a inhibir a los generadores de  $CH_4$ , dando como resultado la siguiente cinética (Figura 9)



**Figura 9.** Cinéticas de producción de hidrógeno.

Se obtuvieron los coeficientes de producción de hidrógeno como se muestra en la Tabla 10. Por un lado, la mayor producción de hidrógeno se obtuvo en la relación de 0.25  $S_0/X_0$  con 299 mL así como la máxima tasa de producción con 36.79 mL/h. Por otra parte la menor fase de latencia se obtuvo cuando se aumentó la concentración de ion Fe, por lo que se podría deber a que el ion Fe acelerar el tiempo de inicio de producción de  $H_2$  contrario lo que observaron Liu y Shen (2004) donde ellos encontraron que mientras aumentaban la concentración de ion Fe el tiempo de latencia

era mayor, en este trabajo el aumento en la concentración de ion Fe no limitó la producción de hidrógeno, siendo atribuido al tipo de sustrato e inóculo que se utilizó.

**Tabla 10.** Coeficientes cinéticos de la producción de hidrógeno de acuerdo con el modelo de Gompertz.

Tratamientos	H <sub>max</sub> (mL)	R <sub>max</sub> (mL/h)	λ (h)
1 S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub>	123.32	5.05	13.81
0.5 S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub>	124.02	7.15	13.81
0.25 S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub>	299.29	36.79	14.31
0 mg/L Fe	147.50	14.37	15.35
75 mg/L Fe	150.65	13.03	13.38
150 mg/L Fe	231.21	15.83	12.72

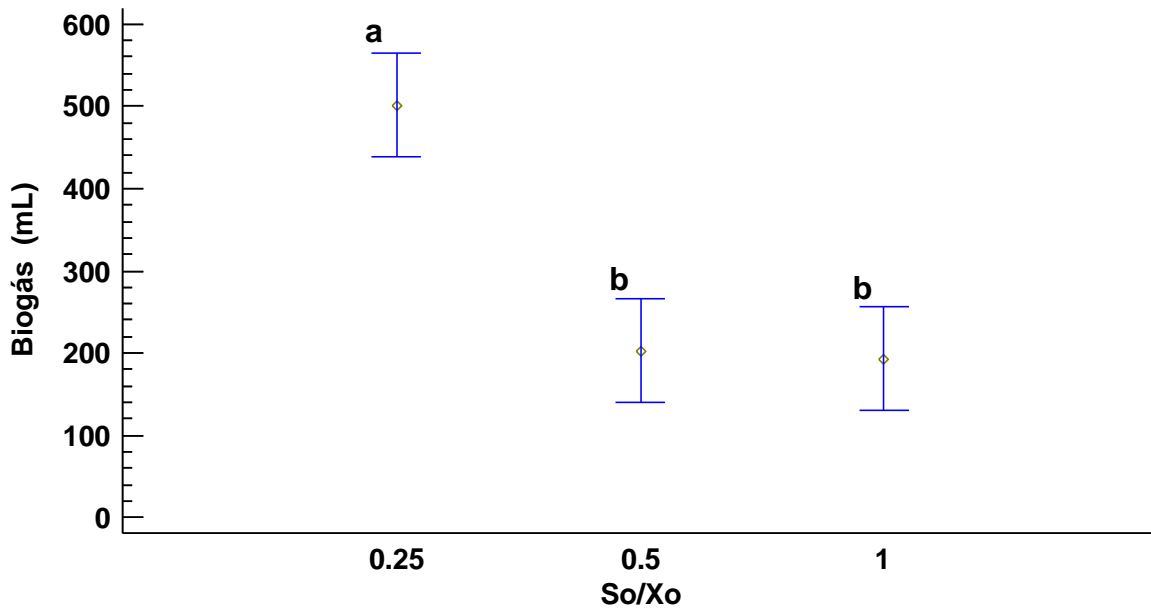
H<sub>max</sub> : máximo volumen de biogás acumulado, R<sub>max</sub> : máxima tasa de producción de biogás, λ : tiempo de fase de latencia.

### 4.3 Producción de biogás

Se realizó un análisis de varianza de la producción de biogás (Tabla 11), así como una comparación múltiple de las medias de cada factor. La media máxima de producción de biogás se encontró en la relación de 0.25 S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> (Figura 10) y 150 mg/L Fe (Figura 11) con 501 mL y 405 mL, respectivamente, ambos factores en esos niveles resultaron ser significativamente diferentes a los demás.

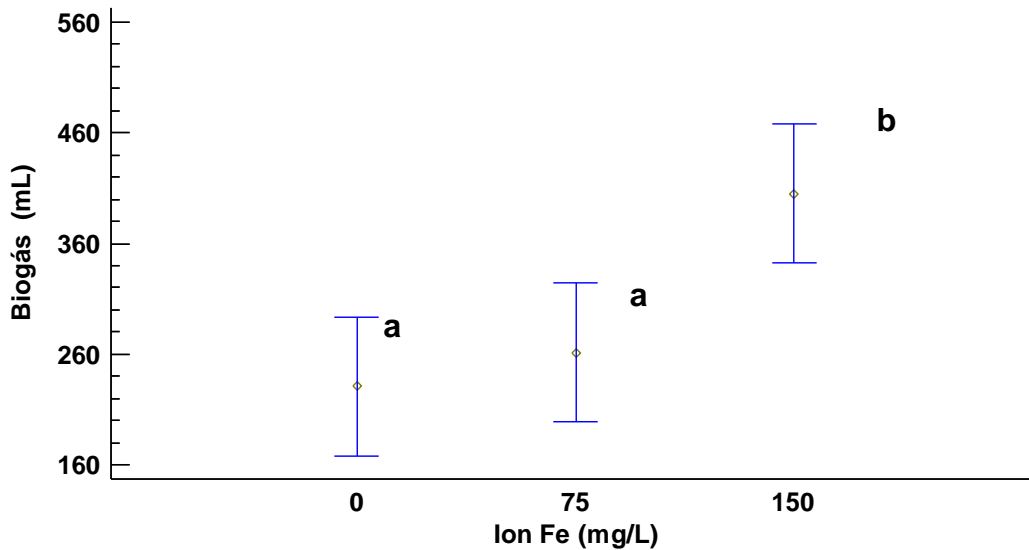
**Tabla 11.** Análisis de varianza de dos factores para la variable biogás.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
S/X	552901.	2	276451.	17.30	0.0001
Ion Fe	155320.	2	77660.1	4.86	0.0205
S/X*Ion Fe	5498.76	4	1374.69	0.09	0.9857
Residuo	287666.	18	15981.4		
Total (corregido)	1.00139E6	26			



Literales diferentes en cada media de cada factor indican que hay diferencia significativa de acuerdo con la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher por contrastes múltiples, cuando  $\alpha = 0.05$ .

**Figura 10.** Comparación múltiple de las medias de la producción de biogás de acuerdo con la relación  $S_0/X_0$ .



Literales diferentes en cada media de cada factor indican que hay diferencia significativa de acuerdo con la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher por contrastes múltiples, cuando  $\alpha = 0.05$ .

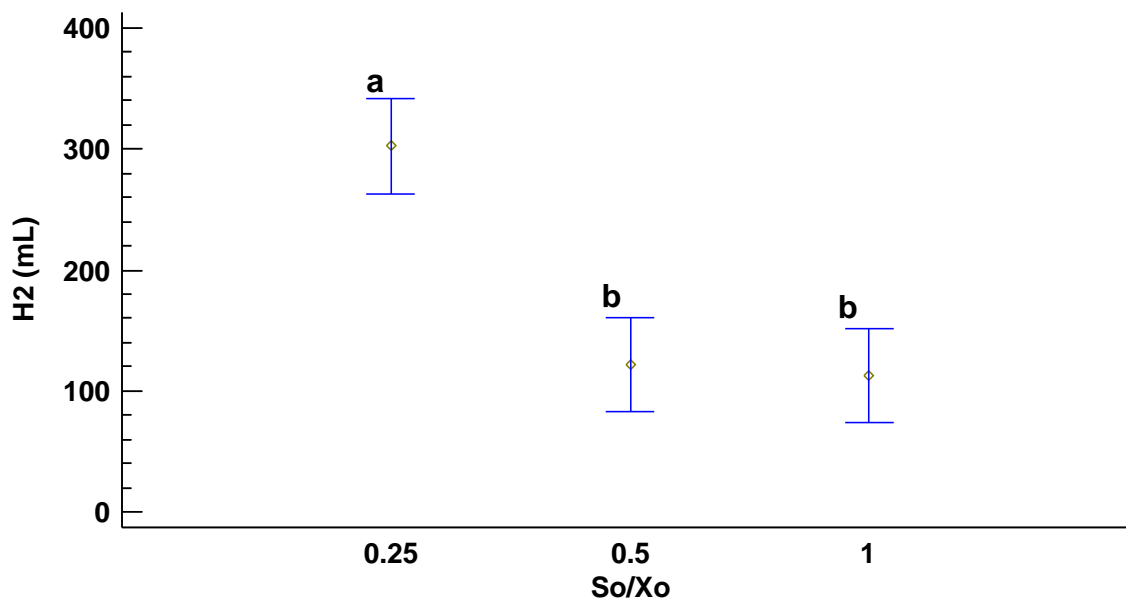
**Figura 11.** Comparación múltiple de las medias de la producción de biogás de acuerdo con la concentración de ion Fe.

## 4.4 Producción de H<sub>2</sub>

Se realizó un análisis de varianza de la producción de hidrógeno (Tabla 12), así como una comparación múltiple de las medias de cada factor. La media máxima de producción de H<sub>2</sub> se encontró en la relación de 0.25 S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub>. (Figura 12) y 150 mg/L Fe (Figura 13) con 302 mL y 233 mL respectivamente, ambos factores en esos niveles resultaron ser significativamente diferentes a los demás.

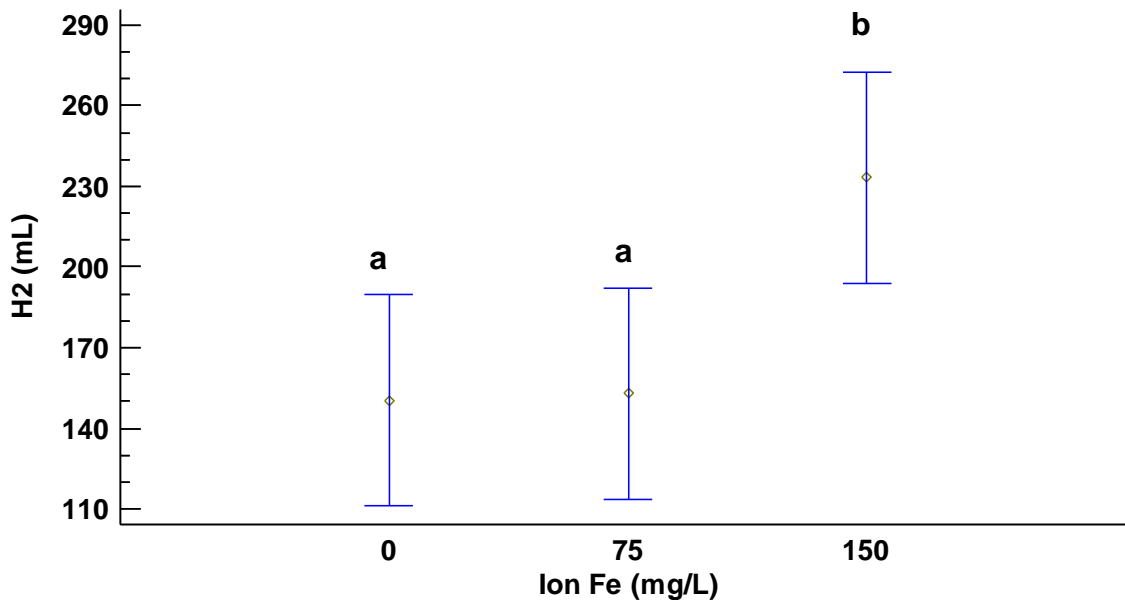
**Tabla 12.** Análisis de varianza para la variable H<sub>2</sub>

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
S/X	188702.	2	94351.2	18.78	0.0000
Ion Fe	57232.6	2	28616.3	5.70	0.0121
S/X*Ion Fe	6640.06	4	1660.02	0.33	0.8539
Residuo	90442.0	18	5024.56		
Total (corregido)	343017.	26			



Literales diferentes en cada media de cada factor indican que hay diferencia significativa de acuerdo con la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher por contrastes múltiples, cuando  $\alpha = 0.05$ .

**Figura 12.** Comparación múltiple de las medias de la producción de H<sub>2</sub> de acuerdo con la relación S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub>.



Literales diferentes en cada media de cada factor indican que hay diferencia significativa de acuerdo con la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher por contrastes múltiples, cuando  $\alpha = 0.05$ .

**Figura 13.** Comparación múltiple de las medias de la producción de H<sub>2</sub> de acuerdo con la concentración ion Fe.

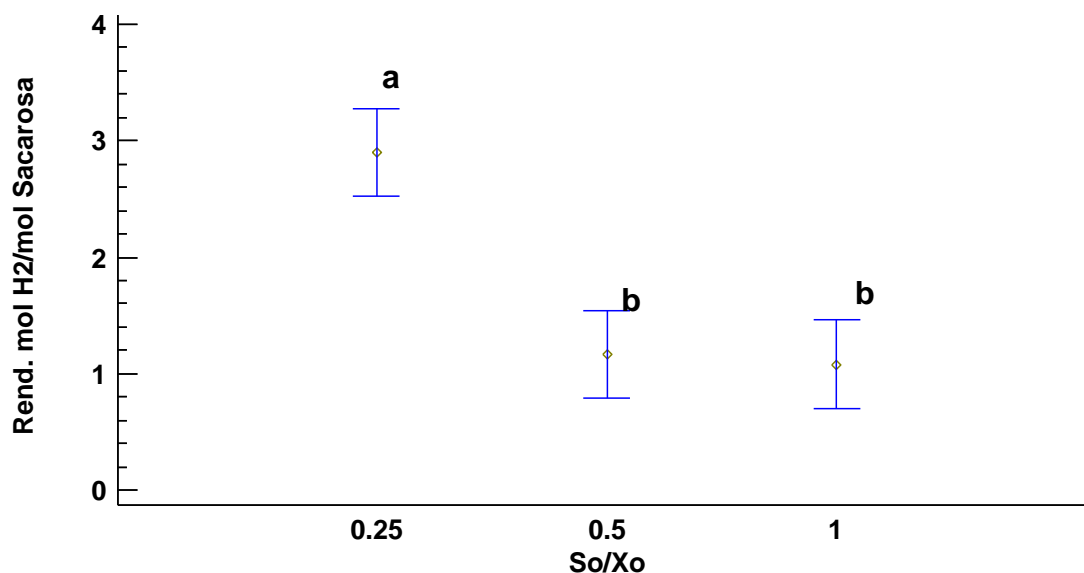
Los procesos de producción biológica de hidrogeno dependen de la presencia de la hidrogenasa, por lo que se podría suponer que la cantidad o actividad de esta enzima podría ayudar o limitar el proceso, ya que el hierro está presente en los citocromos y ferredoxinas por lo que este elemento tendría un efecto en dicha enzima (Alshiyab *et al.*, 2008). Junelles *et al.*, (1988) estudiaron la limitación de la concentración de hierro, señalando que la actividad específica de la hidrogenasa disminuía, al igual que el flujo de carbono y de electrones donde ambos se vieron afectados, en este trabajo se observó que solo la concentración de 150 mg/L de ion Fe tuvo un efecto positivo en la producción de H<sub>2</sub>.

## 4.5 Rendimiento de producción de H<sub>2</sub>

Se realizó un análisis de varianza de la producción del rendimiento mol H<sub>2</sub>/ mol Sacarosa (Tabla 13), así como una comparación múltiple de las medias de cada factor. La media máxima de rendimiento de H<sub>2</sub> se encontró en la relación de 0.25 S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> (Figura 14) y 150 mg/L Fe (Figura 15) con 2.90 mol H<sub>2</sub> / mol Sacarosa y 2.24 mol H<sub>2</sub> / Sacarosa respectivamente.

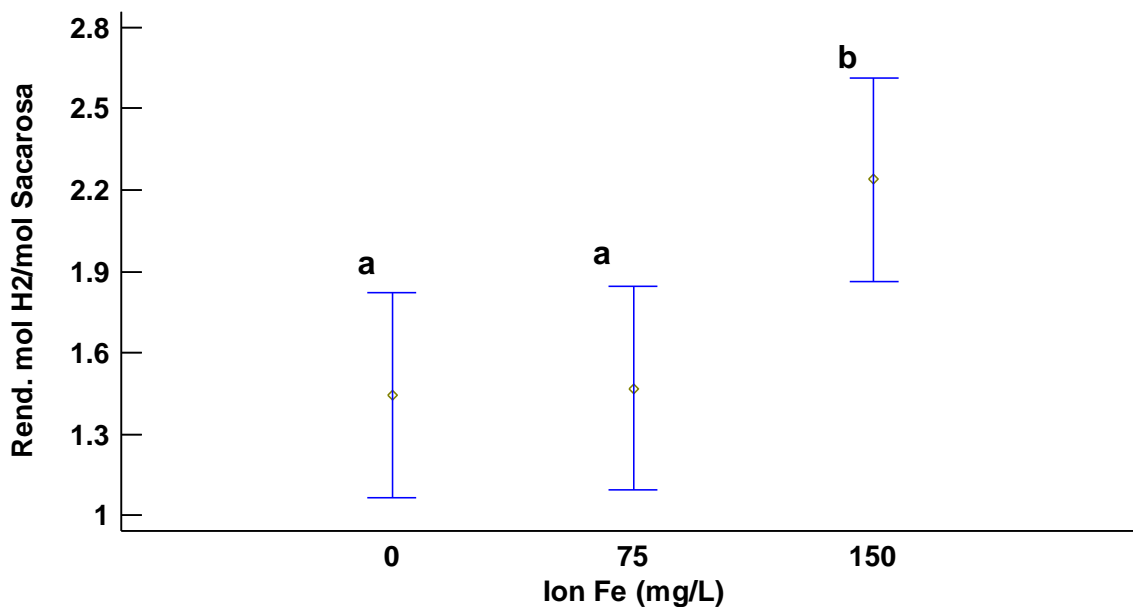
**Tabla 13.** Análisis de varianza dos factores para el rendimiento mol H<sub>2</sub>/ mol sacarosa

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
So/Xo	18.9621	2	9.48105	16.41	0.0001
Ion Fe (mg/L)	3.67939	2	1.83969	3.18	0.0655
So/Xo*Ion Fe (mg/L)	0.756015	4	0.189004	0.33	0.8561
Residuo	10.3997	18	0.577759		
Total (corregido)	33.7972	26			



Literales diferentes en cada media de cada factor indican que hay diferencia significativa de acuerdo con la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher por contrastes múltiples, cuando  $\alpha = 0.05$ .

**Figura 14.** Comparación múltiple de las medias del rendimiento de acuerdo con la relación S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub>.



Literales diferentes en cada media de cada factor indican que hay diferencia significativa de acuerdo con la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher por contrastes múltiples, cuando  $\alpha = 0.05$ .

**Figura 15.** Comparación múltiple de las medias del rendimiento de acuerdo con la concentración de ion Fe.

En la Tabla 14 se observan diferentes rendimientos de la producción de H<sub>2</sub>, en el caso de la concentración de ion Fe, a diferencia de Zhang *et al.*, (2015) donde obtuvieron un rendimiento de 2.73 mol H<sub>2</sub>/ mol sacarosa con 1600 mg/L de FeSO<sub>4</sub> inicial, en este estudio se tuvo rendimiento mayor con 2.90 mol H<sub>2</sub>/ mol sacarosa con una menor concentración de Fe (150 mg/L) empleado. Lee *et al.*, (2001) estudiaron el efecto de la concentración de Fe en la producción de hidrogeno, encontrando que mientras se aumentaba el ión Fe incrementaba la producción, observándose un comportamiento similar en el presente estudio. Sin embargo, el análisis estadístico señala que la adición de ion Fe no presenta un efecto significativo en el rendimiento del H<sub>2</sub>. Tao *et al.*, (2007) reportaron un rendimiento de 3.67 mol H<sub>2</sub>/ mol sacarosa mediante la fermentación oscura dicho rendimiento fue mayor que el obtenido en este trabajo, lo cual puede ser atribuido al inóculo empleado, mientras que Lin y Lay (2005) empleando lodo anaerobio obtuvo 3.43 mol mol H<sub>2</sub>/ mol sacarosa sin embargo el tiempo operación fue mayor.

**Tabla 14.** Comparación de rendimientos de producción de H<sub>2</sub>

Autor	Rendimiento	Inóculo	Condiciones
Tao <i>et al.</i> , (2007)	3.67 mol H <sub>2</sub> / mol sacarosa	Estiércol de ganado y lodos de un reactor de biogás	Fermentación oscura Pretratamiento del inóculo a 112° C a 0, 2, 3, 5 o 7 h. pH 6
Zhang <i>et al.</i> , (2005)	2.73 mol H <sub>2</sub> / mol sacarosa	Cultivo mixto	1600 mg/L FeSO <sub>4</sub> pH 7.4-7.6
Lin y Lay (2005)	3.43 mol mol H <sub>2</sub> / mol sacarosa	Lodo anaerobio	Pretratamiento 100°C/ 45 min 60 h operación pH 6.55

#### 4.6 Producción de AGVs

La producción de hidrógeno suele ir acompañada de la producción de ácidos grasos junto con la producción de solventes. La producción de estos intermedios refleja cambios en la ruta metabólica de los microorganismos involucrados.

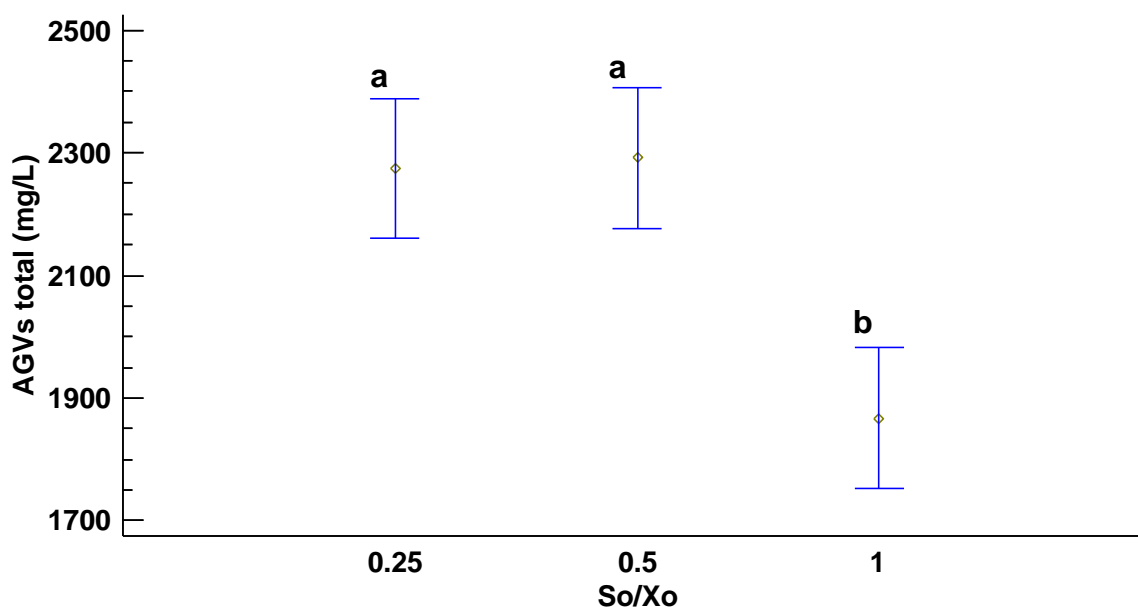
Se realizó un análisis de varianza de los AGVs (Tabla 14), además de una comparación múltiple de las medias. La menor producción de AGVs se encontró en la relación de 1 S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> (Figura 16) y 0 mg/L Fe (Figura 17) con 1866.96 mg/L y 1486.25 mg/L respectivamente. En el caso de la concentración de ion Fe los tres niveles resultaron tener un efecto significativo en la producción de AGVs, en el factor S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> el único nivel significativo fue la relación de 1.



**Tabla 15.** Análisis de varianza de dos factores para la variable AGVs<sub>totales</sub>

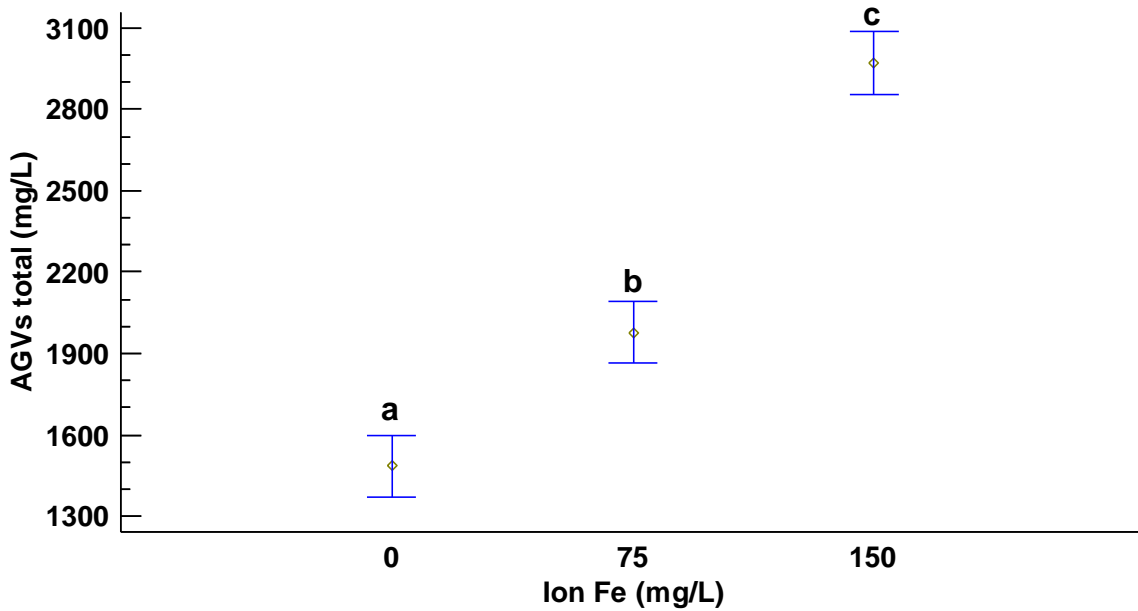
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
S/X	1.04212E6	2	521058.	9.75	0.0014
Ion Fe	1.02816E7	2	5.14078E6	96.17	0.0000
S/X*Ion Fe	683705.	4	170926.	3.20	0.0378
Residuo	962235.	18	53457.5		
Total (corregido)	1.29696E7	26			

Intanoo *et al.*, (2012) observaron que un ligero aumento en la concentración de AGVs impactaba en la actividad microbiana afectando el rendimiento de la producción de hidrógeno. En el caso de la relación de  $S_0/X_0$ , la concentración de AGV fue más alta cuando las relaciones  $S_0/X_0$  eran más bajas (Figura 16).



Literales diferentes en cada media de cada factor indican que hay diferencia significativa de acuerdo con la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher por contrastes múltiples, cuando  $\alpha = 0.05$ .

**Figura 16.** Comparación múltiple de las medias de la producción de AGVs totales de acuerdo con la relación  $S_0/X_0$ .



Literales diferentes en cada media de cada factor indican que hay diferencia significativa de acuerdo con la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher por contrastes múltiples, cuando  $\alpha = 0.05$ .

**Figura 17.** Comparación múltiple de las medias de la producción de AGVs totales de acuerdo con la concentración de ion Fe.

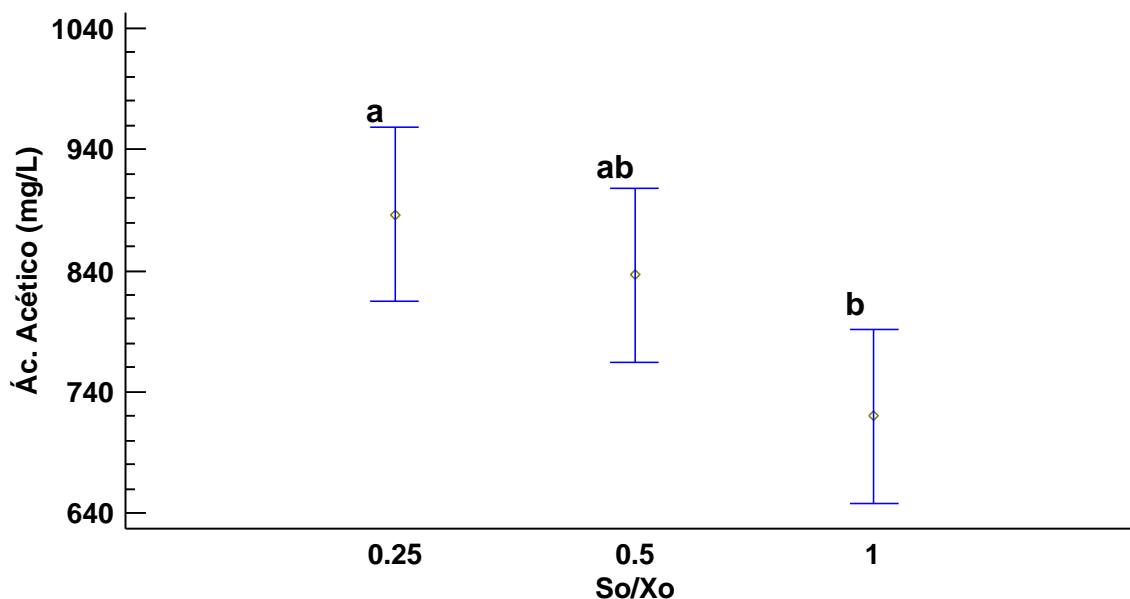
Se presentó un aumento de la concentración de AGVs (Figura 17)) cuando la concentración de Fe aumentaba. La mayoría de los AGVs detectados en este estudio fueron el acético, propanoico y butírico. A continuación, se muestran las medias de cada AGV:

#### 4.6.1 Ácido acético

Se realizó un análisis de varianza de la producción de la concentración de ácido acético (Tabla 15), así como una comparación múltiple de las medias de cada factor. La media máxima de concentración de ácido acético se encontró en la relación de 0.25  $S_0/X_0$  (Figura 18) y 150 mg/L Fe (Figura 19) con 886.41 mg/L y 1159 mg/L respectivamente.

**Tabla 16.** Análisis de varianza de dos factores para la variable ácido acético

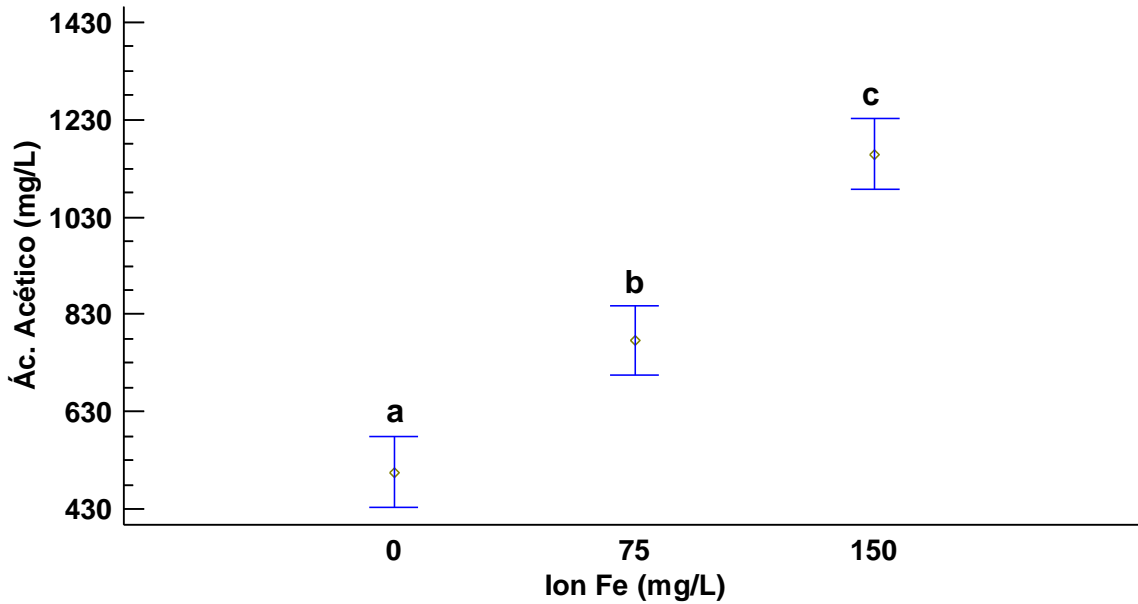
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
S/X	131352.	2	65676.2	3.12	0.0685
Ion Fe	1.93612E6	2	968058.	46.04	0.0000
S/X*Ion Fe	318712.	4	79678.0	3.79	0.0209
Residuo	378508.	18	21028.2		
Total (corregido)	2.76469E6	26			



Literales diferentes en cada media de cada factor indican que hay diferencia significativa de acuerdo con la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher por contrastes múltiples, cuando  $\alpha = 0.05$ .

**Figura 18.** Comparación múltiple de las medias de la producción de ácido acético de acuerdo con la relación  $S_0/X_0$ .

Una reacción predominante a la formación de ácido acético generalmente favorece a la producción de hidrogeno, sin embargo, el aumento de la concentración de los demás ácidos podría deberse a la presencia de diferentes tipos de *Clostridium* en el inóculo, tal es el caso de *C. butyrium* para la producción de ácido butírico, por lo que el cambio de las tasas de ácido acético/ ácido butírico implica una alteración en el ambiente influyendo en la producción de hidrogeno (Khanal *et al.*, 2004).



Literales diferentes en cada media de cada factor indican que hay diferencia significativa de acuerdo con la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher por contrastes múltiples, cuando  $\alpha = 0.05$ .

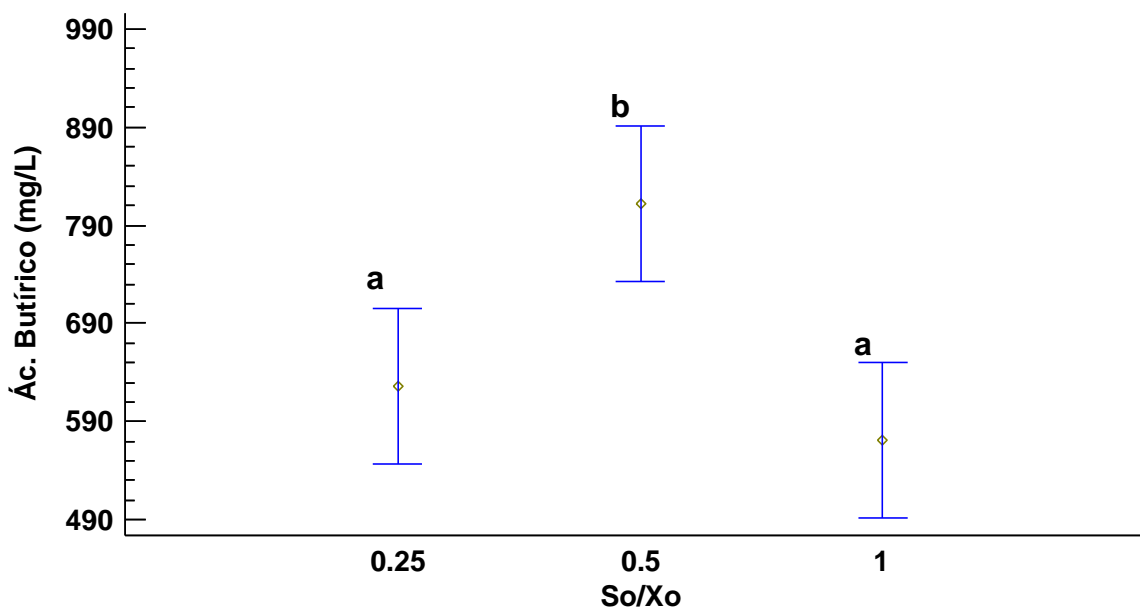
**Figura 19.** Comparación múltiple de las medias de la producción de ácido acético de acuerdo con la concentración de ion Fe.

#### 4.6.2 Ácido butírico

Se realizó un análisis de varianza de la producción de la concentración de ácido butírico (Tabla 17), así como una comparación múltiple de las medias de cada factor. La media máxima de concentración de ácido butírico se encontró en la relación de 0.50  $S_0/X_0$  (Figura 20) y 150 mg/L Fe (Figura 21) con 811.92 mg/L y 992.14 mg/L respectivamente.

**Tabla 17.** Análisis de varianza de dos factores para la variable ácido butírico

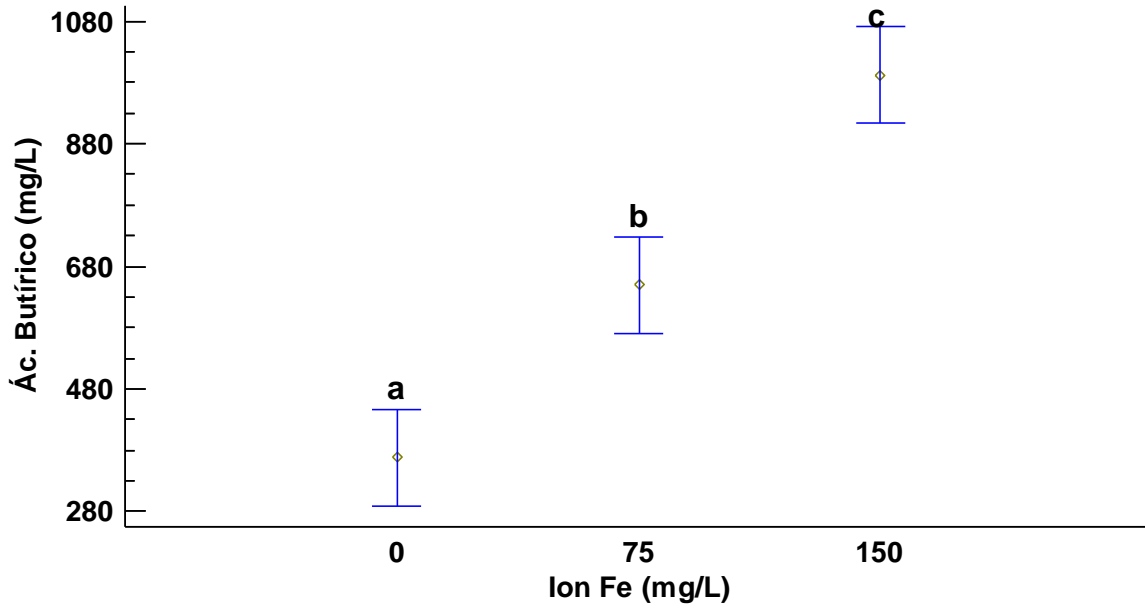
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
S/X	286224.	2	143112.	5.68	0.0122
Ion Fe	1.76195E6	2	880973.	34.97	0.0000
S/X*Ion Fe	107627.	4	26906.8	1.07	0.4010
Residuo	453410.	18	25189.4		
Total (corregido)	2.60921E6	26			



Literales diferentes en cada media de cada factor indican que hay diferencia significativa de acuerdo con la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher por contrastes múltiples, cuando  $\alpha = 0.05$ .

**Figura 20.** Comparación múltiple de las medias de la producción de ácido butírico de acuerdo con la relación  $S_0/X_0$ .

La producción de ácido butírico se vio afectada por la concentración de ion Fe de manera proporcional como se puede observar en la Figura (21) a diferencia de Junelles *et al.*, (1988) donde no encontraron un efecto de la limitación Fe en la producción de ácido butírico, pero sí en la generación de butanol, pudiéndose deber al tipo de inóculo ya que en su estudio utilizaron un inóculo puro, mientras que en este estudio fue uno mixto.



Literales diferentes en cada media de cada factor indican que hay diferencia significativa de acuerdo con la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher por contrastes múltiples, cuando  $\alpha = 0.05$ .

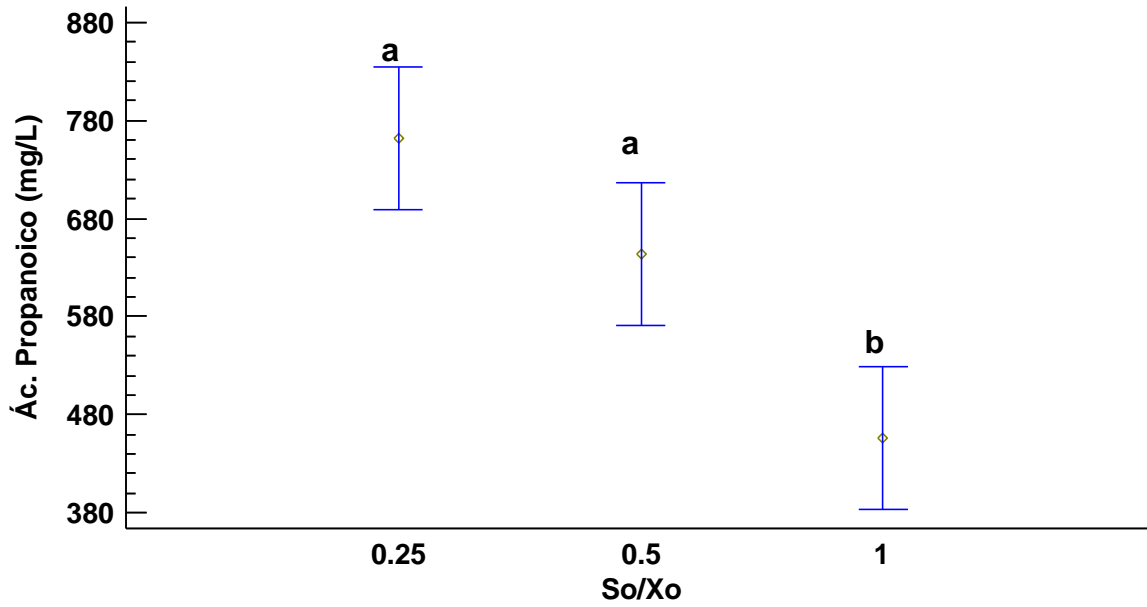
**Figura 21.** Comparación múltiple de las medias de la producción de ácido butírico de acuerdo con la concentración de ion Fe.

#### 4.6.3 Ácido propanoico

Se realizó un análisis de varianza de la producción de la concentración de ácido propanoico (Tabla 18), así como una comparación múltiple de las medias de cada factor. La media máxima de concentración de ácido acético se encontró en la relación de  $0.25 S_0/X_0$  (Figura 22) y 150 mg/L Fe (Figura 23) con 762.25 mg/L y 818.54 mg/L respectivamente.

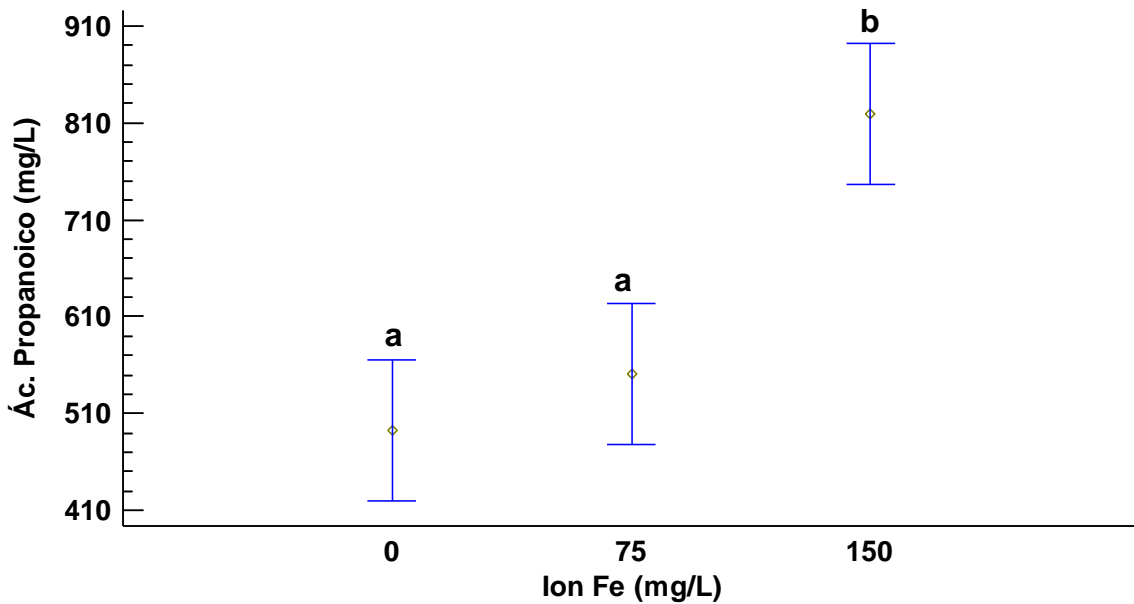
**Tabla 18.** Análisis de varianza de dos factores para la variable ácido propanoico.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
S/X	429203.	2	214602.	9.91	0.0013
Ion Fe	543898.	2	271949.	12.56	0.0004
S/X*Ion Fe	331621.	4	82905.2	3.83	0.0202
Residuo	389752.	18	21652.9		
Total (corregido)	1.69447E6	26			



Literales diferentes en cada media de cada factor indican que hay diferencia significativa de acuerdo con la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher por contrastes múltiples, cuando  $\alpha = 0.05$ .

**Figura 22.** Comparación múltiple de las medias de la producción de ácido propanoico de acuerdo con la relación  $S_0/X_0$ .



Literales diferentes en cada media de cada factor indican que hay diferencia significativa de acuerdo con la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher por contrastes múltiples, cuando  $\alpha = 0.05$ .

**Figura 23.** Comparación múltiple de las medias del ácido propanoico de acuerdo con la concentración de ion Fe.

Como se ha mencionado, un contenido alto de ácido acético o butírico pueden llevar a una buena producción de hidrógeno y por consiguiente a un buen rendimiento, por el contraste una mayor cantidad de ácido propanoico puede resultar en una disminución del rendimiento de producción de hidrógeno, sin embargo, en este estudio se observó que las concentraciones más altas obtenidas de este ácido se presentaron en las mayores producciones de hidrógeno por lo que no se observó que afectara en la producción de hidrógeno, esto pudiéndose deber que a pesar de que las concentraciones eran altas del ácido propiónico estas nunca fueron superior a las del ácido acético.

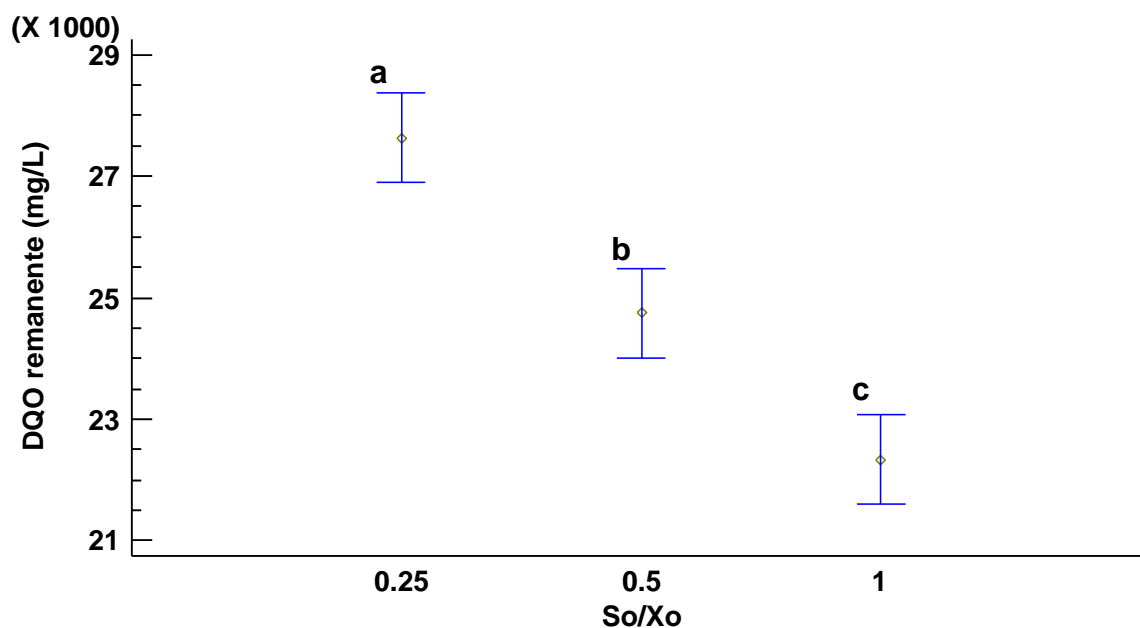
#### 4.7 DQO remanente

Se realizó un análisis de varianza de la DQO remanente (Tabla 19), así como una comparación múltiple de las medias de cada factor. La media máxima de concentración de DQO remanente se encontró en la relación de  $0.25 S_0/X_0$  (Figura 24) y 0 mg/L ion Fe (Figura 25) con 27633 mg/L y 25548 mg/L respectivamente, en la relación  $S_0/X_0$  los tres niveles resultaron tener un efecto significativo, mientras que el otro factor sólo la concentración de 0 y 150 mg/L de Fe tuvieron efecto.

**Tabla 19.** Análisis de varianza de dos factores para la variable DQO remanente

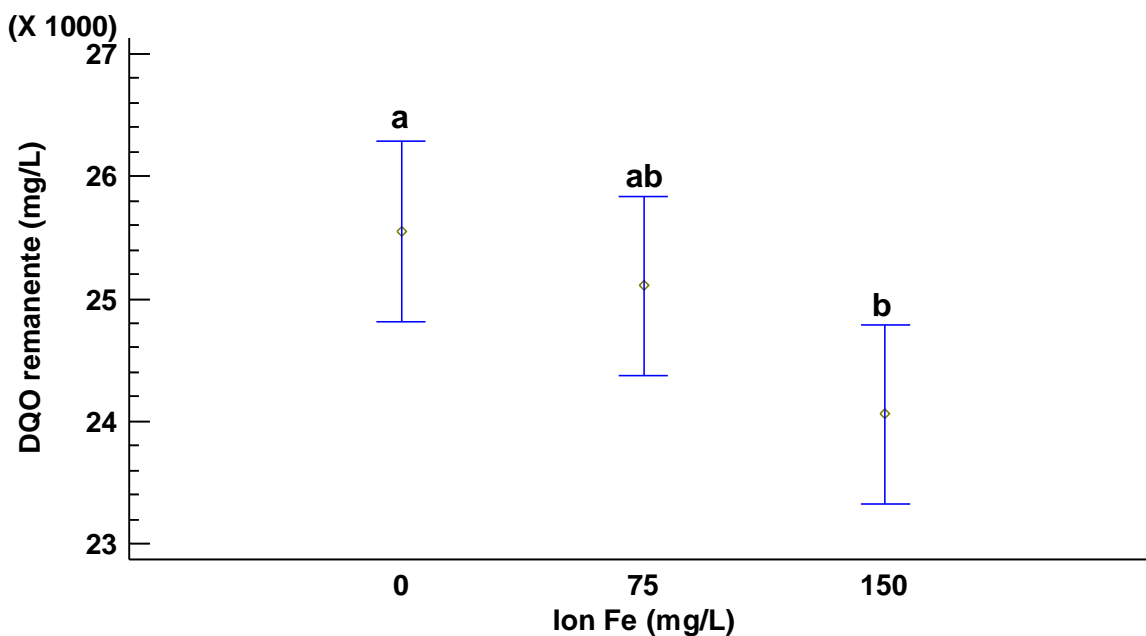
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
S/X	1.26576E8	2	6.3288E7	28.99	0.0000
Ion Fe	1.0529E7	2	5.26448E6	2.41	0.1181
S/X*Ion Fe	695720.	4	173930.	0.08	0.9876
Residuo	3.92964E7	18	2.18313E6		
Total (corregido)	1.77097E8	26			





Literales diferentes en cada media de cada factor indican que hay diferencia significativa de acuerdo con la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher por contrastes múltiples, cuando  $\alpha = 0.05$ .

**Figura 24.** Comparación múltiple de las medias de DQO remanente de acuerdo con la relación  $S_0/X_0$ .



Literales diferentes en cada media de cada factor indican que hay diferencia significativa de acuerdo con la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher por contrastes múltiples, cuando  $\alpha = 0.05$ .

**Figura 25.** Comparación múltiple de las medias de DQO remanente de acuerdo con la concentración de ion Fe.

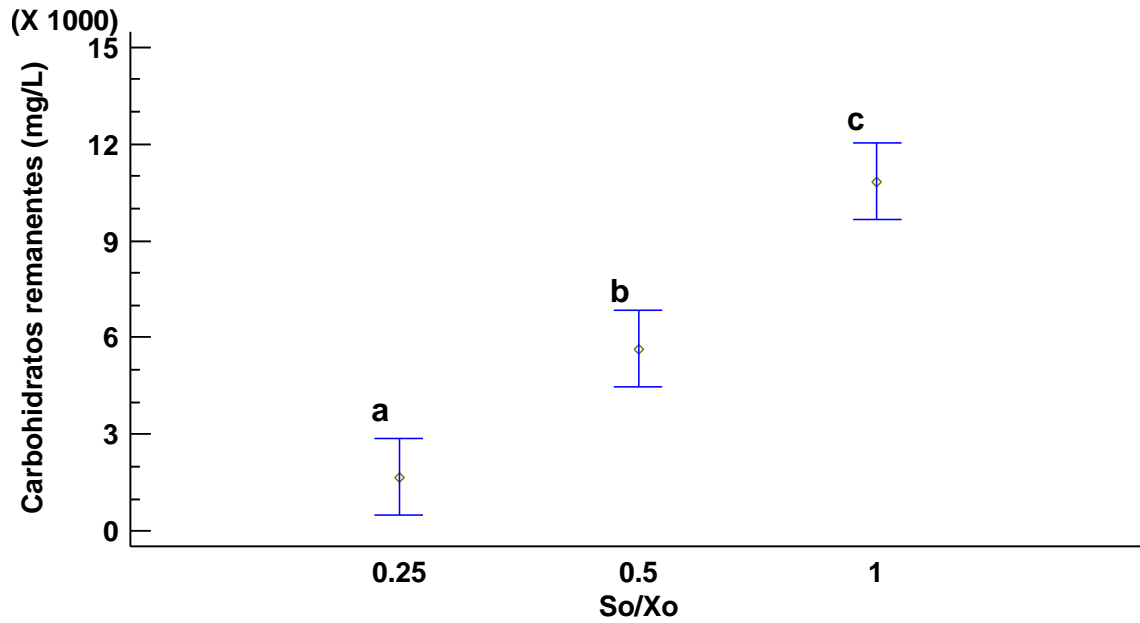
La demanda química de oxígeno nos indica que la materia orgánica compleja fue degradada y convertida en biogás, aquí se obtuvieron altas concentraciones de DQO remanente, lo que quiere decir que hubo poca remoción de este parámetro, siendo la máxima de 15 %, el cual pudo estar influenciado por los ácidos grasos volátiles generados, ya que durante la fermentación oscura se pueden producir ácido acético, butírico y propiónico como metabolitos solubles. Ghimire *et al.*, (2015) señalan que se pueden dar tasas bajas de reducción de DQO, además de que influye la cantidad de subproductos generados como AGV y alcoholes.

#### 4.8 Carbohidratos remanentes

Se realizó un análisis de varianza de los carbohidratos remanentes (Tabla 20), así como una comparación múltiple de las medias de cada factor. La menor concentración de carbohidratos remanentes se encontró en la relación de 0.25  $S_0/X_0$  y 150 mg/L Fe con 1682 mg/L (Figura 26) y 4339 mg/L respectivamente (Figura 27). En la relación  $S_0/X_0$  los tres niveles resultaron tener un efecto significativo, de igual manera el cambio en las concentraciones de Fe.

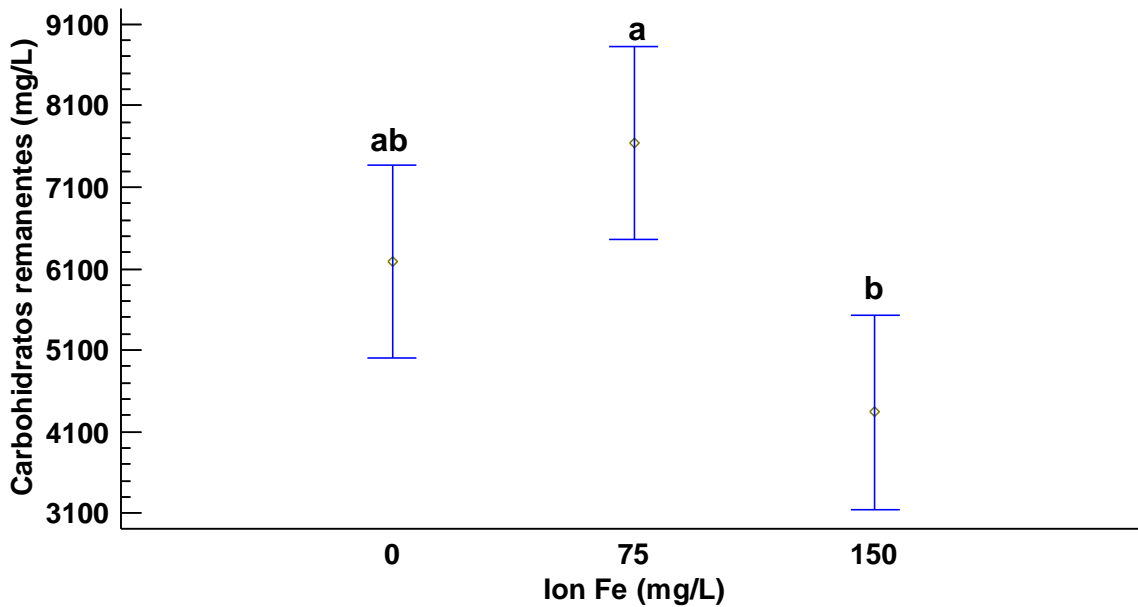
**Tabla 20.** Análisis de varianza de dos factores para la variable carbohidratos remanentes.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
S/X	3.78926E8	2	1.89463E8	32.97	0.0000
Ion Fe	4.93643E7	2	2.46821E7	4.30	0.0298
S/X*Ion Fe	4.08541E7	4	1.02135E7	1.78	0.1774
Residuo	1.0343E8	18	5.74611E6		
Total (corregido)	5.72574E8	26			



Literales diferentes en cada media de cada factor indican que hay diferencia significativa de acuerdo con la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher por contrastes múltiples, cuando  $\alpha = 0.05$ .

**Figura 26.** Comparación múltiple de las medias de carbohidratos remanentes de acuerdo con la relación  $S_0/X_0$ .



Literales diferentes en cada media de cada factor indican que hay diferencia significativa de acuerdo con la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher por contrastes múltiples, cuando  $\alpha = 0.05$ .

**Figura 27.** Comparación múltiple de las medias de carbohidratos remanentes de acuerdo con la concentración de ion Fe.

La eficiencia de la degradación de sustrato se estimó dividiendo la media de carbohidratos consumidos entre los carbohidratos iniciales, donde los menores porcentajes de carbohidratos remanentes se presentaron en las relaciones de 0.25  $S_0/X_0$  las cuales alcanzaron más de un 90% de consumo, esto debiéndose posiblemente a que en estas relaciones se presenta la mayor cantidad de inóculo por lo que hay un mayor consumo de sustrato, por otra parte cuando la concentración del ion Fe era mayor se observó un mayor consumo de sustratos.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

Se encontró que la relación  $S_0/X_0$  y la concentración Fe tienen un efecto significativo en las variables de respuesta. La interacción entre estos dos factores no resultó significativa para ninguna de las variables.

El porcentaje de  $H_2$  contenido en el biogás fue mayor del 50% a partir de las 20 h de operación, alcanzando un máximo de 68% de  $H_2$  en el biogás, no fue detectado  $CH_4$  indicando que el pretratamiento térmico al inóculo fue adecuado para suprimir los microorganismos metanogénicos. El mayor rendimiento de  $H_2$  se presentó en la relación 0.25  $S_0/X_0$  siendo de 2.90 mol  $H_2$ /mol de sacarosa, además, en esta relación también se presentó la mayor tasa de producción de  $H_2$  siendo de 36.79 mL/h. En la comparación de las medias se obtuvo que la relación 0.25  $S_0/X_0$  y la concentración de ion Fe tuvieron un efecto significativo en la producción de biogás e  $H_2$ , mientras que sólo la relación 0.25  $S_0/X_0$  tuvo un efecto significativo en el rendimiento.

La producción de AGVs fue cuantificada, siendo predominante la presencia de ácido actico y butírico, asociándose a una buena producción de  $H_2$ . La remoción de DQO se encontró en un rango de 10-15%, por otra parte, el menor contenido de carbohidratos remanente se presentó en las relaciones de 0.25  $S_0/X_0$ , obteniendo un porcentaje de consumo mayor al 90%.

## CAPÍTULO 6

### RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones, se recomienda realizar el balance de masa del carbono con el propósito de determinar la ruta de transformación de este elemento. Para esto, se deberá hacer un análisis elemental y porcentaje de carbono orgánico e inorgánico presentes en el sustrato e inóculo, tanto al inicio como al final del proceso de operación de la fermentación oscura.

La producción de ácidos grasos volátiles puede representar un problema en la producción de hidrógeno además de repercutir en el medio ambiente; por lo tanto, es necesario emplear técnicas que ayuden a disminuir o utilizar estos subproductos de la fermentación oscura.

Debido a que la fermentación oscura genera una reducción parcial de la DQO, se recomienda utilizar el digestato en una segunda etapa para la producción de metano, con lo cual se logrará una mayor reducción de la DQO y un mejor tratamiento de las aguas residuales.

Por último, será importante establecer los niveles adecuados de la relación sustrato – inóculo y concentración del ion hierro con sustratos diferentes a la sacarosa, por lo que se recomienda utilizar un diseño de análisis de superficie con el propósito de encontrar las condiciones óptimas que generen el mayor rendimiento en la producción de hidrogeno ( $\text{mL H}_2 / \text{mol}_{\text{sustrato}}$ ).

## REFERENCIAS

- Adekunle, K., Okolie J., (2015). A review of biochemical process of anaerobic digestion. "Advances in Bioscience and Biotechnology" 06 :205-212.
- Alexandropoulou, M., Antonopoulou, G., Lyberatos, G. (2018). A novel approach of modeling continuous dark hydrogen fermentation. "Bioresource Technology" 250: 784–792.
- Albalasmeh, A., Berhe, A., Ghessehei, T., (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. "Carbohydrate Polymers" 97: 253– 261
- Alshiyab, H., Kalil, M., Hamid, A., Wan, W., (2008). Trace Metal Effect on Hydrogen Production Using C.acetobutylicum. OnLine "Journal of Biological Sciences" 8 (1): 1-9.
- Aminnejad, M., (2017). Investigation of bio-hydrogen and bio-methane production from potato waste. "Electronic Theses and Dissertations". 7233.
- Andre, L., Ndiaye, M., Pernier, M., Lespinard, O., Paus, A., Lamy, E., Ribeiro, T., (2016). Methane production improvement by modulation of solid phase immersion in dry batch anaerobic digestion process: dynamic of methanogen populations. "Bioresource Technology". 207 353-360.
- Argun, H., Kargi, F., (2009). Effects of sludge pre-treatment method on bio-hydrogen production by dark fermentation of waste ground wheat. "International Journal of Hydrogen Energy" 34:8543-8548
- Association, APH, Association, AWW, Federation, WE (2012). Standard Methods for examination of water and wastewater. (APHA, AWWA, WEF: Washington, D.C.)
- Balat, M., (2008). Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems. "International journal of hydrogen energy" 33:4013–4029
- Blanco, S., Rodríguez, T. (2012). Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura: una revisión crítica (1993-2011). "Ingeniare" 20, 398-411.
- Chaganti, S., Kim, D., Lalman, J., (2012). Dark fermentative hydrogen production by mixed anaerobic cultures: Effect of inoculum treatment methods on hydrogen yield. "Renewable Energy" 48:0 117-121.
- Dincer, I., Acar, C., (2015). Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability. "International journal of hydrogen energy" 40:11094-11111

Dhar, B., Elbeshbishy, E., Hafez, H., Lee, H., (2015). Hydrogen production from sugar beet juice using an integrated biohydrogen process of dark fermentation and microbial electrolysis cell. "Bioresource Technology" 198: 223-230.

Elbeshbishy, E., Dharb, R., Nakhla, G., Leed, H-S., (2017). A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. "Renewable and Sustainable Energy Reviews" 79: 656–668.

Fan., K. Chen., Y. (2004). H<sub>2</sub> Production through anaerobic mixed culture: effect of batch S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> and shock loading in CSTR. "Chemosphere", 57: 1059-1068.

Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P.N.L., Esposito, G., (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. "Applied Energy", 144:73–95.

Ghimire, A., Sposito, F., Frunzo, L., Trably, E., Escudie, R., Pirozzi, F., (2016). Effects of operational parameters on dark fermentative hydrogen production from biodegradable complex waste biomass. "Waste Manag" 50:55-64.

Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., Steyer, J-P., (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: a review. "International Journal Hydrogen Energy" 35:10660–73.

Gujer, W. Zehnder, (1983) Conversion processes in anaerobic digestion. Wat. Sci. Tech., vol. 15, p. 127-167.

Hao, X., Zhou, M., Yu, H., She, Q., (2006). Effect of sodium ion concentration on hydrogen production from sucrose by anaerobic hydrogen-producing granular sludge. "Chinese Journal. Chemical Engineering", 14(4) 5 11-5 17.

Intanoo, P., Chavadej, J., Chavadej, S., (2012) Effect of COD loading rate on hydrogen production from alcohol wastewater. World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Chemical and Molecular Engineering Vol:6, No:4.

Junelles, A., Janati-Idrissi, R., Petitdemange, H., Gay, R. (1988) Iron effect on acetone–butanol fermentation. "Current Microbiology", 17:299–303.

Kandylis, P., Bekatorou, A., Pissaridi, K., Lappa, K., Dima, A., Kanellaki M., Koutinas A.A., (2016). Acidogenesis of cellulosic hydrolysates for new generation biofuels. "Biomass Bioenergy" 91: 210-216.

Khan, M.A., Ngo, H.H., Guo, W.S., Liu, Y.W., Zhou, J.L., Zhang, J., Liang, S., Ni, B.J., Zhang, X.B., Wang, J., (2016a). Comparing the value of bioproducts from different stages of anaerobic membrane bioreactors. "Bioresource Technology" 214: 816-825.



Khan, M.A., Ngo, H.H, Guo, W.S., Liu, Y., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Deng, L.J., Wang, J., Wu, Y., (2016b). Optimization of process parameters for production of volatile fatty acid, biohydrogen and methane from anaerobic digestion. "Bioresource Technology", 219: 738-748.

Khan, M.A., Ngo, H.H., Guo, W., Liu, Y., Zhang, X., Guo, J., Chang S., Nguyen, D., Wang, J., (2017). Biohydrogen production from anaerobic digestion and its potential as renewable energy. "Renewable Energy" 1-15

Khanal, S., Chen W., Li, L., Sung, S. (2004). Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. "International Journal of Hydrogen Energy" 29:1123-31.

Kumaran, P., Hephzibah, D., Sivasankari, R., Saifuddin, N., Shamsuddin, A.H., (2016). A review on industrial scale anaerobic digestion systems deployment in Malaysia: opportunities and challenges. "Renewable Sustainable" 56: 929-940.

Lee, Y.J, Takashi, M., Tatsuya, N., (2001). Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. "Bioresource Technology" 80: 227-231.

Lee, Y.J, Miyahara, T., Noike, T., (2002). Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. "Journal Chemical Technol Biotechnology". 77:694–8.

Li, C., Fang, H., (2007). Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. "Critical Reviews in Environmental Science and Technology", 37:1, 1-39.

Lin, C., Lay C., (2005). A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. "International Journal of Hydrogen Energy" 30:285–292

Liu, Y. (1996). Bioenergetic interpretation on the So/Xo ratio in substrate-sufficient batch culture, vol. 30: 2766-70.

Lui, G., y Shen, J., (2004). Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. Journal of Bioscience and Bioengineering Vol. 98, No. 4, 251–256.

Liu, I., Whang,L., Ren, W., Lin,P.,(2011). The effect of pH on the production of biohydrogen by clostridia: thermodynamic and metabolic considerations. "International Journal of Hydrogen Energy" 36:439-449.

Luo, G., Karakashev, D., Xie, L., Zhou, Q., Angelidaki, I., (2011). Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. "Biotechnology Bioengineering" 108:1816–27.

Marone, A., Ayala, O., Trably, E., Carmona, A., Moscoviz, R., Latrille, E., Steyer, J.-P., Alcaraz, V., Bernet, N. (2017). Coupling dark fermentation and microbial electrolysis to enhance bio-hydrogen production from agroindustrial wastewaters and by-products in a bio-refinery framework. "International Journal of Hydrogen Energy" 42 (3), 1609–1621.

Morales, S., Rizo P., Hernández M., Dávila J. (2015). Producción de biohidrógeno en un reactor continuo UASB. "Revista Cubana de Química" 27(1), 65-78.

Moreno, I, Moreno, G, Kumar, G, Buitrón, G (2015). Biohydrogen production from industrial wastewaters. "Water Science and Technology" 71:105.

Sarmiento, F., Leigh, J.A., Whitman, W.B., (2011). Genetic systems for hydrogenotrophic methanogens. "Methods in Enzymology" 494:43-73.

Tallarico, M., Hirasawa, J., Amâncio M. (2014). Development and validation of two methods to quantify volatile acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid extraction (LLE)." American Journal of Analytical Chemistry" 5: 406-414.

Tao, Y., Chen, Y., Wu, Y., He, Y., Zhou, Z., (2007). High hydrogen yield from a two-step process of dark-and photo-fermentation of sucrose. International Journal of Hydrogen Energy 32. 200–206

Vignais, P., Magnin, J., Willison, J., (2006). Increasing biohydrogen production by metabolic engineering. "International Journal of Hydrogen Energy" 31: 1478 – 1483.

Yang, H., Shen, J. (2006). Effect of ferrous iron concentration on anaerobic bio-hydrogen production from soluble starch. "International Journal of Hydrogen Energy" 31: 2137 – 2146

Zhang, Y., Liu, G., Shen, J., (2005) Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations. International Journal of Hydrogen Energy 30 (2005) 855–860