



---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**UNIDAD DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**“EFECTO DEL PRETRATAMIENTO TÉRMICO EN LA  
PRODUCCIÓN DE BIO-HIDRÓGENO”**

**TESIS**

PRESENTADA POR:

**LIC. EN AGROEC.  
MANUEL EMILIO CANTO ROBERTOS**

EN OPCIÓN AL GRADO DE

**MAESTRO EN INGENIERÍA**

**OPCIÓN AMBIENTAL**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2018

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca que brindó la oportunidad de completar mis estudios en un posgrado del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

A la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) por haberme brindado la oportunidad de estudiar el posgrado Maestría en Ingeniería Opción Ambiental, en esta prestigiosa universidad del sureste de México.

A la Facultad de Ingeniería de la UADY por el apoyo del personal docente y operativo para la elaboración de esta tesis denominada: "EFECTO DEL PRETRATAMIENTO TÉRMICO EN LA PRODUCCIÓN DE BIO-HIDRÓGENO".

.

# Índice

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
LISTA DE TABLAS .....	I
LISTA DE FIGURAS .....	II
ABREVIATURAS .....	III
RESUMEN .....	IV
ABSTRACT .....	V
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>1</b>
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. HIPÓTESIS .....	3
3. OBJETIVOS .....	3
3.1. Objetivo general .....	3
3.2. Objetivos específicos .....	3
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>4</b>
4. MARCO TEÓRICO.....	4
4.1. Situación energética en el siglo XXI .....	4
4.2. Producción de hidrógeno como fuente de energía renovable .....	5
4.2.1. Tratamiento de aguas residuales por digestión anaerobia .....	7
4.3. Procesos de la digestión anaerobia.....	8
4.3.1. Fase de hidrólisis .....	9
4.3.2. Fase de fermentación.....	10
4.3.3. Fase acetogénica .....	12
4.3.4. Fase de metanogénesis .....	13
4.4. Factores que afectan la producción de hidrógeno.....	15
4.4.1. pH.....	15
4.4.2. Temperatura.....	16
4.4.3. Presión del hidrógeno .....	16
4.4.4. Diseño y operación del reactor.....	16
4.4.5. Composición microbiana del inóculo .....	17
4.5. Inhibición de MCH en el inóculo .....	17

4.5.1.	Soluciones ácido-base .....	18
4.5.2.	Congelación y descongelamiento.....	18
4.5.3.	Ultrasonificación .....	18
4.5.4.	Choques térmicos .....	19
4.6.	Aplicación del pretratamiento térmico a consorcios microbianos. ....	19
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>.....</b>	<b>23</b>
5.	METODOLOGÍA.....	23
5.1.	Origen del inóculo y aplicación choque térmico .....	23
5.2.	Preparación de las unidades experimentales .....	23
5.3.	Métodos analíticos.....	25
5.3.1.	Composición del biogás .....	25
5.3.2.	Caracterización de los subproductos de la fermentación .....	26
5.4.	Diseño experimental.....	27
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
6.1.	Caracterización del inóculo .....	28
6.2.	Caracterización del biogás .....	29
6.2.1.	Producción de biogás.....	29
6.2.2.	Producción de hidrógeno y metano.....	32
6.3.	Subproductos de la fermentación oscura .....	38
6.3.1.	pH, COT y DQO de la fracción líquida .....	38
6.3.2.	Ácidos grasos volátiles .....	41
7.	CONCLUSIONES .....	46
8.	RECOMENDACIONES.....	47
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48

## Lista de tablas

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Tabla 1. Ventajas y desventajas de la digestión anaerobia sobre la digestión aerobia. .....	8
Tabla 2. Grupo de enzimas hidrolíticas y sus funciones. ....	9
Tabla 3. Tipos de fermentación y productos originados. ....	10
Tabla 4. Propuesta del diseño experimental. ....	27
Tabla 5. Composición física y química de los inóculos utilizados.....	28
Tabla 6. Efecto del pretratamiento y el tipo de inóculo en el volumen biogás y CO <sub>2</sub> . .....	29
Tabla 7. Coeficientes cinéticos en la producción de biogás, de acuerdo con el modelo de Gompertz.....	31
Tabla 8. Efecto del pretratamiento y el tipo de inóculo sobre el volumen de hidrógeno y metano.....	32
Tabla 9. Rendimiento de hidrógeno reportados en la literatura mediante choque térmico. ....	37
Tabla 10. Valores de pH final, DQO <sub>s</sub> y COT <sub>s</sub> por pretratamiento e inóculo.....	40
Tabla 11. Composición de ácidos grasos volátiles en el contenido de los reactores. .....	45

## Lista de figuras

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Comparación de los 3 tipos de producción de bio-hidrógeno.....	6
Figura 2. Vías metabólicas de la descomposición anaerobia de la principal materia orgánica.....	11
Figura 3. Producción de hidrógeno a partir del piruvato.....	11
Figura 4. Reacciones que ocurren durante la acetogénesis. ....	12
Figura 5. Principales reacciones metanogénicas. ....	14
Figura 6. Esquema del montaje de los reactores en condición por lotes. ....	25
Figura 7. Volumen acumulado de biogás de acuerdo con el pretratamiento y tipo de inóculo.....	30
Figura 8. Comportamiento cinético en la producción de biogás.....	30
Figura 9. Volumen acumulado de hidrógeno de acuerdo con el pretratamiento y tipo de inóculo.....	32
Figura 10. Producción acumulada de H <sub>2</sub> de acuerdo con el modelo de Gompertz. ....	33
Figura 11. Porcentaje de remoción de DQO por tipo de pretratamiento y de inóculo. ....	40
Figura 12. Porcentaje de remoción de COT <sub>s</sub> por tipo de pretratamiento y de inóculo. ....	41
Figura 13. Concentración de HAc, HPr y HBU en los diferentes tratamientos.....	42

## Abreviaturas

<b>AGV</b>	Ácidos grasos volátiles
<b>COTs</b>	Carbono orgánico total de la parte soluble
<b>DQOs</b>	Demanda química de oxígeno de la parte soluble
<b>HAc</b>	Ácido Acético
<b>HBu</b>	Ácido butírico
<b>HPr</b>	Ácido propiónico
<b>JAPAY</b>	Junta de Agua Potable y Alcantarillado de Yucatán
<b>LC</b>	Lodo anaerobio municipal sin aplicación de pretratamiento
<b>LT</b>	Lodo anaerobio municipal con pretratamiento térmico
<b>MCH</b>	Microorganismos consumidores de hidrógeno
<b>MPH</b>	Microorganismos productores de hidrógeno
<b>PC</b>	Lodo anaerobio porcícola sin aplicación de pretratamiento
<b>PT</b>	Lodo anaerobio porcícola con pretratamiento térmico
<b>PTAR</b>	Planta de tratamiento de aguas residuales
<b>RC</b>	Líquido ruminal bovino sin aplicación de pretratamiento
<b>RT</b>	Líquido ruminal bovino con pretratamiento térmico
<b>SST</b>	Sólidos suspendidos totales
<b>SSV</b>	Sólidos suspendidos volátiles
<b>ST</b>	Sólidos totales
<b>UASB</b>	Reactor anaerobio de flujo ascendente con manto de lodos

## Resumen

Se ha propuesto como fuente de energía renovable la generación de hidrógeno por medio de procesos biológicos al emplearse residuos municipales, agrícolas e industriales como sustrato alimenticio a microorganismos productores de hidrógeno. Entre las técnicas de producción de producir bio-hidrógeno se encuentra la fermentación oscura, la cual se utilizó en la presente tesis al evaluar el efecto del pretratamiento térmico en tres inóculos mixtos provenientes de una planta de aguas residuales (PTAR) municipal, PTAR porcina y líquido ruminal bovino.

Por ello, los cultivos mixtos fueron pretratados a 105 °C por 24 h para ser inoculados en botellas serológicas de 120 mL, incubados a 37 °C con agitación de 150 rpm durante 40 h de operación a un pH inicial de 5.5, recibiendo sacarosa (eq. 20 g DQO/L) como fuente alimenticia a una relación sustrato-inóculo de 4:1.

Los resultados indican que el pretratamiento térmico incrementó el volumen de biogás e hidrógeno, obteniendo el mejor rendimiento con el lodo anaerobio municipal ( $0.53 \text{ mol H}_2/\text{mol}_{\text{sustrato}}$ ) y lodo anaerobio porcino ( $0.37 \text{ mol H}_2/\text{mol}_{\text{sustrato}}$ ), con una remoción del  $16.1 \pm 7.6 \%$  de la DQO<sub>s</sub> y  $68.9 \pm 4.1 \%$  de la COT<sub>s</sub>. Así mismo, el choque térmico favoreció una ruta fermentativa mixta de tipo acética/butírica e inhibió la actividad de las metanogénicas al generarse menos del 0.5 % de metano en el biogás. Finalmente, el líquido ruminal exhibió un inestable comportamiento al presentar volúmenes de hidrógeno semejante al tratamiento control.

**Palabras claves:** bio-hidrógeno, choque térmico, fermentación oscura, vía fermentativa.

## Abstract

Dark fermentation can be used as a renewable energy source through hydrogen production. This method requires eliminate hydrogen consuming microorganisms by means of pretreatments like heat-shock. This study investigated the performance of apply heat shock pretreatment using municipal wastewater sludge, swine wastewater sludge and ruminal liquid as seed.

To enrich hydrogen-producing microflora, the seeds were pretreatment at 105 °C for 24 h. The pretreatment seed was inoculated into serum bottles of 120 mL. The temperature of medium was kept at 35 °C with initial pH value of 5.5 and agitation rate at 150 rpm. Sucrose was used like substrate to a concentration of 20 g COD/L, maintaining a S/X of 4:1.

Heat shock pretreatment improved the biogas and hydrogen volumen, and suppressed methanogenesis. The best performances of hydrogen production were observed for municipal wastewater sludge (0.53 mol H<sub>2</sub>/mol<sub>substrate</sub>) and swine wastewater sludge (0.37 mol H<sub>2</sub>/mol<sub>substrate</sub>). The fermentation pathway produced butyric acid and acetic acid as main products. Ruminal liquid showed an irregular behaviour which obtained a hydrogen production similar to untreated seed.

**Key words:** bio-hydrogen, heat shock pretreatment, dark fermentation, fermentative pathway.

# Capítulo 1

## 1. Introducción

El desarrollo de la civilización humana ha hecho uso de múltiples recursos naturales para satisfacer sus diferentes necesidades (alimentación, salud, recreación, servicios), utilizando diversas fuentes de energía para la transformación de los recursos. En la actualidad, las principales fuentes de energía provienen del carbón y derivados (29 %), crudo y petrolíferos (31 %), gas natural (21 %), nuclear (5 %) y renovables (14 %) (SENER 2016); en donde las tres primeras fuentes están asociadas a emisiones de gases de efecto invernadero (GEI).

A nivel mundial se han reconocido que los GEI han afectado a los patrones climático, por lo cual, los gobiernos, universidades y organizaciones de la sociedad civil (OSC) han conjuntado esfuerzos para la mitigación y adaptación de las consecuencias del cambio climático (CMNUCC 1992; IPCC 2014).

Entre los esfuerzos internacionales está el desarrollo y fomento de energías renovables como las hidroeléctricas, eólicas, solares, biomasa y biogás; siendo esta última, obtenida mayormente a partir del tratamiento de la materia orgánica en aguas residuales, por medio de procesos biológicos anaerobios, del cual se obtiene una mezcla de metano ( $\text{CH}_4$ ) y dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (Ruggeri et al. 2015a, 2015b).

Diversos estudios (Kawagoshi et al. 2005; Mu et al. 2007; Cai et al. 2009) han propuesto la producción de hidrógeno ( $\text{H}_2$ ) por medio de los procesos anaerobios, mediante la inhibición de la formación del metano a partir del sustrato. Este fomento se debe a el hidrógeno es un vector energético muy importante, ya que no genera GEI, produciendo solamente agua como producto de su oxidación, aunado a su alto poder calorífico.

Durante el proceso anaerobio, el hidrógeno producido durante la fermentación oscura es consumido por microorganismos metanogénicos consumidores de hidrógeno (MCH), ocasionando escasa formación de  $\text{H}_2$  (Cai y Wang 2016). Debido a lo anterior, ha sido necesario el conocer los factores que inhiben la etapa metanogénica.

Diversas técnicas se han empleado para inhibir a los MCH como la aplicación de choques térmicos, soluciones ácido-base, aireación, congelamiento y descongelamiento, aplicación de cloroformo, iodopropano y sodio 2-bromoetanosulfato (Wang y Wan 2008; Cai y Wang 2016).

De los anteriores, se ha investigado el efecto de aplicar choques térmicos por altas temperaturas como método de pretratamiento a la fuente de inóculo, al ser una manera fácil y efectiva de eliminar a los MCH, logrando de este modo, que la microflora resultante sea rica en bacterias productoras de hidrógeno, las cuáles logran sobrevivir gracias a su tolerancia a las condiciones extremas (Kawagoshi et al. 2005; Cai et al. 2009).

Se ha reportado la utilización de temperaturas en un rango de 60-100 °C con tiempo de exposición de 5-120 min (Kawagoshi et al. 2005; Mu et al. 2007; Ren et al. 2008; Cai et al. 2009; Cai y Wang 2016), para la inactivación de los MCH. Estos estudios han tenido amplia diversidad en los resultados debido a la fuente del inóculo y al tipo de residuo utilizado.

Considerando que en el estado de Yucatán existe una gran disponibilidad de fuentes de inóculos, como los lodos anaerobios de plantas de tratamiento de aguas municipales, lodos anaerobios de granjas porcícolas y líquido ruminal proveniente de la ganadería bovina, es necesario investigar en qué temperatura los MCH son inactivados del consorcio microbiano, con el fin de obtener el mejor inóculo que produzca suficientes cantidades de H<sub>2</sub>, para su potencial uso en la estabilización de residuos agrícolas, urbanos e industriales.

Por lo anterior, se plantea la siguiente pregunta de investigación ¿Cómo afecta el tiempo y temperatura del tratamiento térmico a un consorcio microbiano de diferentes fuentes en la producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura?

## **2. Hipótesis**

El uso del pretratamiento térmico en inóculos mixtos incrementa el volumen de hidrógeno y la concentración de ácidos grasos volátiles durante el proceso de la fermentación oscura, al inactivar a los microorganismos consumidores de hidrógeno.

## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto de un pretratamiento térmico sobre la producción de biohidrógeno mediante el proceso de fermentación oscura en tres inóculos mixtos.

### **3.2. Objetivos específicos**

- Determinar la producción de hidrógeno en función del origen del inóculo y pretratamiento térmico usado.
- Analizar el efecto del pretratamiento térmico y la fuente de inóculo sobre los subproductos de la fermentación.

# Capítulo 2

## 4. Marco teórico

### 4.1. Situación energética en el siglo XXI

Durante el desarrollo de la civilización humana se ha hecho uso de múltiples recursos naturales para satisfacer sus diferentes necesidades (alimentación, salud, recreación, servicios), utilizando diversas fuentes de energía, lo cual ha traído enormes consecuencias: lluvia ácida, contaminación de mares y suelos, destrucción de bosques, residuos radiactivos, cambio climático global y agotamiento de recursos no renovables (Gonzalez y Márquez 2008).

Entre las principales fuentes de energías, aquellas provenientes del carbón y derivados, crudo y petrolíferos, y gas natural han sido asociadas a las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) (SENER 2016).

Al entrar en vigor la Convención sobre el Cambio en 1994, se definió que los GEI son aquellos gases atmosférico que absorbe y emite radiación dentro del rango infrarrojo, siendo estos el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), metano ( $\text{CH}_4$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), hidrofluorocarbonos (HFC), perfluorocarbonos (PFC) y hexafluoruro de azufre ( $\text{SF}_6$ ) (CMNUCC 1999).

Se ha reconocido que los GEI han afectado a los patrones climático, por lo cual, los gobiernos, universidades y organizaciones de la sociedad civil (OSC) han conjuntado esfuerzos para la mitigación y adaptación de las consecuencias del cambio climático, el cual es definido como la variación global del clima de la Tierra debido a causas naturales y a la acción humana (CMNUCC 1992; Gonzalez y Márquez 2008; IPCC 2014).

El calentamiento global de la Tierra es uno de los problemas que mayor cantidad de actividad científica y política internacional ha generado, con la firma del Protocolo de Kyoto, en el que se han promulgado acuerdos sustantivos para la protección del medio ambiente, como el desarrollo y fomento de energías renovables como las

hidroeléctricas, eólicas, solares, biomasa y biogás (Gonzalez y Márquez 2008; Ruggeri et al. 2015a; IEA 2016).

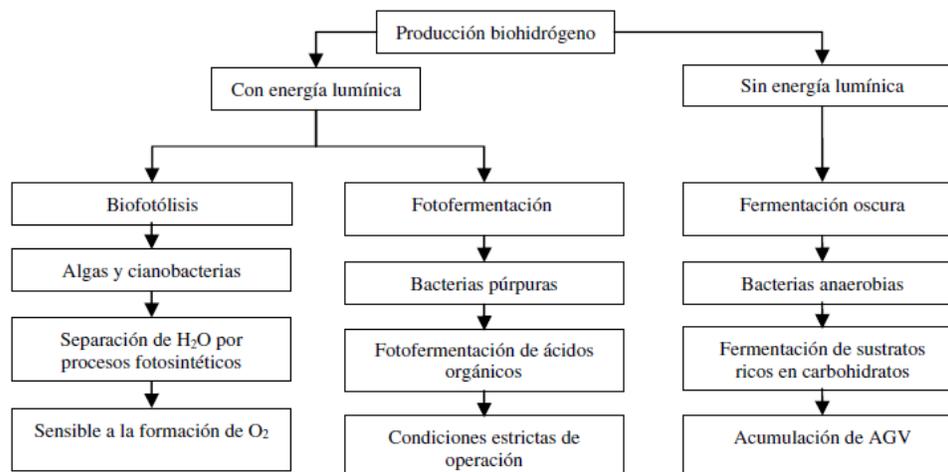
#### **4.2. Producción de hidrógeno como fuente de energía renovable**

Entre las energías renovables, los biocombustibles, son producidos de biomasa, cuya energía puede obtenerse en estado líquido mediante la fermentación de azúcares o gaseoso a través de la descomposición anaerobia de la materia orgánica, dando como resultado el bio-metano, bio-etanol, bio-diesel, bio-hidrógeno, biogás, entre otros (Aguilar et al. 2009; Bundhoo y Mohee 2016).

Se ha fomentado el uso de hidrógeno como fuente de energía debido a que no genera GEI, produciendo solamente agua como producto de su oxidación, aunado a su alto poder calorífico de 122 kJ/g, a diferencia del metano que posee 50 kJ/g (Kawagoshi et al. 2005; Mu et al. 2007; Cai et al. 2009). La demanda de hidrógeno no es exclusiva como fuente de energía, ya que es ampliamente utilizado en las industrias química, de alimentos y en la producción de derivados electrónicos, entre otros; lo que genera una creciente necesidad de producir hidrógeno de una manera sostenible y económicamente viable (Kapdan y Kargi 2006).

Actualmente, el 40 % del gas hidrógeno se obtiene de la oxidación catalítica de gases naturales, el 30 % de metales pesados y nafta, el 18 % de carbón, el 4 % de la electrólisis y cerca del 1 % de biomasa (Sinha y Pandey 2011); a pesar de esto, su comercialización ha sido limitada debido a su escasa producción en gran escala (Bundhoo y Mohee 2016).

Los estudios en la producción de hidrógeno biológico (bio-hidrógeno) se han enfocado principalmente en la biofotólisis del agua empleando algas y cianobacterias, la fotofermentación de compuestos orgánicos por bacterias fotosintéticas y la fermentación oscura de compuestos orgánicos ricos en carbohidratos mediante bacterias estrictamente anaerobias o anaerobias facultativas en ausencia de luz (Argun y Kargi 2011; Blanco y Rodríguez 2012; Juárez y Castro 2013).



**Figura 1.** Comparación de los 3 tipos de producción de bio-hidrógeno (Blanco & Rodríguez, 2012).

Los procesos de biofotólisis y fotofermentación para la producción de bio-hidrógeno son más complejos y de alto costo, por lo que la producción de hidrógeno por fermentación oscura es la opción más viable, debido a su mayor capacidad de producir H<sub>2</sub> y de degradar sustratos complejos, tales como residuos agrícolas (residuos de cultivos y alimentos, estiércol), efluentes industriales con grandes contenidos de carbohidratos y aguas residuales de industrias procesadoras de productos alimenticios (Kapdan y Kargi 2006; Bedoya et al. 2008; Guo et al. 2010).

Sin embargo, la producción de bio-hidrógeno a partir de la fermentación oscura ha sido baja a nivel mundial y aún está en desarrollo las estrategias para enriquecer el biogás con H<sub>2</sub> (Kapdan y Kargi 2006; Bundhoo y Mohee 2016).

Diversos estudios (Kawagoshi et al. 2005; Mu et al. 2007; Cai et al. 2009; Argun y Kargi 2011; Bundhoo y Mohee 2016) han propuesto la producción de hidrógeno por medio de los procesos anaerobios con el fin de enriquecer el biogás con hidrógeno.

En los procesos de digestión anaerobia, el biogás proviene mayormente de desechos de bovinos, porcinos, restos vegetales y alimenticios, aguas residuales municipales, así como aguas industriales ricas en carbohidratos (Avaci et al. 2013; Ruggeri et al. 2015a). Este biogás es principalmente compuesto por metano (CH<sub>4</sub>), dióxido de

carbono ( $\text{CO}_2$ ) y pequeñas cantidades de sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ), mercaptano (RSH) e hidrógeno ( $\text{H}_2$ ) (Ramalho 2003).

Para lograr enriquecer de hidrógeno al biogás obtenido de la fermentación oscura, se han propuesto estrategias como la inhibición de la etapa metanogénica durante la digestión anaerobia (Kawagoshi et al. 2005; Mu et al. 2007; Cai et al. 2009; Argun y Kargi 2011; Bundhoo y Mohee 2016).

#### **4.2.1. Tratamiento de aguas residuales por digestión anaerobia**

Los procesos anaerobios han sido usados en el tratamiento de aguas residuales para estabilizar sólidos, solubilizar la materia orgánica, inactivar patógenos y degradar altas concentraciones sólidos suspendidos. Comparado con los procesos aerobios, la calidad del efluente no es tan buena y es más sensitivo a los cambios de carga y compuestos tóxicos (Grady et al. 2011).

En el proceso de digestión anaerobia, la materia orgánica es convertida biológicamente a metano y dióxido de carbono, en un reactor cerrado, en el que la extracción del lodo se hace de forma continua o intermitente. Son utilizados mayormente dos tipos de diseño, digestores de alta y baja carga, teniendo diferencias en el tiempo de retención de los sólidos, recirculación del lodo, medio de crecimiento de la biopelícula, y calentamiento-mezcla del contenido (Tchobanoglous et al. 2003; Grady et al. 2011).

El efluente producido por el tratamiento anaerobio contiene materia orgánica solubilizada, la cual es favorable de ser tratada en sistemas aerobios; por lo cual se recomienda la combinación de ambos procesos (Gray 2010).

Muchas aguas residuales son difíciles de tratar por procesos aeróbicos debido a los costos de satisfacer la alta demanda de oxígeno para mantener las condiciones aerobias, aunado a que la mayoría del carbón orgánico removido en los tratamientos aerobios, es convertido en lodo, el cual debe ser estabilizado por digestión anaerobia (Gray 2010).

Las ventajas y desventajas de la digestión anaerobia para el tratamiento de aguas residuales son las siguientes:

**Tabla 1.** Ventajas y desventajas de la digestión anaerobia sobre la digestión aerobia Ramalho (2003).

Ventajas	Desventajas
Se produce ahorro de coste al no utilizar equipo de aireación.	Se necesita mayor tiempo de residencia, por lo cual se elevan los costes de inversión en volumen del reactor.
Se produce menos biomasa por unidad de reducción de sustrato, por lo cual se presenten ahorros en el manejo y evacuación del exceso de lodos.	Malos olores asociados al H <sub>2</sub> S y mercaptanos.
Es posible operar cargas orgánicas superiores al de los procesos aerobios.	Temperaturas cercanas a 35 °C para asegurar el proceso anaerobio, lo cual puede requerir inversión en sistemas de precalentamiento.
La producción de biogás con valor como combustible.	La sedimentación de la biomasa anaerobia en el clarificador secundario es más difícil que la decantación de la biomasa en el proceso de lodos activados.
	La operación de las unidades anaerobias es más difícil que las aerobias, siendo el proceso más sensible a las cargas de choque.

Lo anterior deja ver que la digestión anaeróbica tiene diversas ventajas tales como el bajo consumo de energía, baja producción de lodos, el requerimiento de espacios más pequeños, la reducción del volumen de residuos y la producción de biofertilizantes (Adekunle y Okolie 2015).

#### **4.3. Procesos de la digestión anaerobia**

De acuerdo a Gray (2010), el proceso de la descomposición anaerobia comprende 4 fases:

- 1) Hidrólisis de los carbohidratos de alto peso molecular, grasas y proteínas, las cuales son insolubles, a compuestos solubles por la acción enzimática.
- 2) Los compuestos solubles son transformados a una variedad de ácidos orgánicos (acético, butírico y propiónico), alcoholes, hidrógeno y dióxido de carbono, por las bacterias ácido-fermentadoras.
- 3) Los ácidos orgánicos y alcoholes son convertidos a ácido acético por las bacterias acetogénicas.

- 4) Esta fase es la más sensible a la inhibición. Las bacterias metanogénicas convierten el ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono a metano. El 70 % del metano proviene del ácido acético, por lo cual, la metanogénesis es totalmente dependiente de la producción de ácido acético. Sin embargo, en la práctica las bacterias metanogénicas tienen una lenta tasa de crecimiento que las bacterias ácido-fermentativas.

Cuando la degradación anaerobia de la materia es controlada hasta el paso 3, se está llevando a cabo la producción de hidrógeno por medio de la fermentación oscura, ya que se está propiciando la acumulación del gas H<sub>2</sub>, debido a la ausencia de MCH en un medio aislado de la energía lumínica (Argun y Kargi 2011; Blanco y Rodríguez 2012; Juárez y Castro 2013).

#### 4.3.1. Fase de hidrólisis

En esta fase, los compuestos orgánicos son convertidos de polímeros a monómeros, siendo solubilizados por enzimas excretadas por bacterias hidrolíticas que actúan en el exterior celular (Lorenzo y Obaya 2005). Las enzimas transforman los compuestos orgánicos insolubles y de alto peso molecular (lípidos, polisacáridos, proteínas, grasas, ácidos nucleicos, entre otros) a compuestos orgánicos solubles (monosacáridos, aminoácidos, ácidos grasos, entre otros) que serán usados como fuente de carbón y energía para los microorganismos (Adekunle y Okolie 2015).

**Tabla 2.** Grupo de enzimas hidrolíticas y sus funciones (Adekunle y Okolie 2015).

Enzima	Sustrato	Producto
Proteinasa	Proteínas	Aminoácidos
Celulasa	Celulosa	Celobiasa y glucosa
Hemicelulasa	Hemicelulosa	Azúcares como glucosa, xilosa, manosa y arabinosa
Amilasa	Almidón	Glucosa
Lipasa	Grasas	Ácidos grasos y glicerol
Peptinasa	Peptinas	Azúcares como galactosa, arabinosa y ácido poligalacturónico

Dentro de las bacterias anaerobias, que participan en las fases de hidrólisis y acidogénesis, se encuentran *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Micrococcus* y *Clostridium* que interactúan con algunas bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*; las cuales secretan diferentes tipos de enzimas, llamadas

enzimas extracelular, las cuáles cortan las cadenas largas a piezas más pequeñas (Lorenzo y Obaya 2005; Adekunle y Okolie 2015; Corrales et al. 2015).

#### 4.3.2. Fase de fermentación

Durante esta fase, también llamada fermentación ácida, los productos resultantes de las reacciones de fermentación de azúcares y aminoácidos son productos intermediarios como ácido butírico y propiónico, y precursores del metano, como ácido acético e hidrógeno (Grady et al. 2011; Corrales et al. 2015; Ruggeri et al. 2015c).

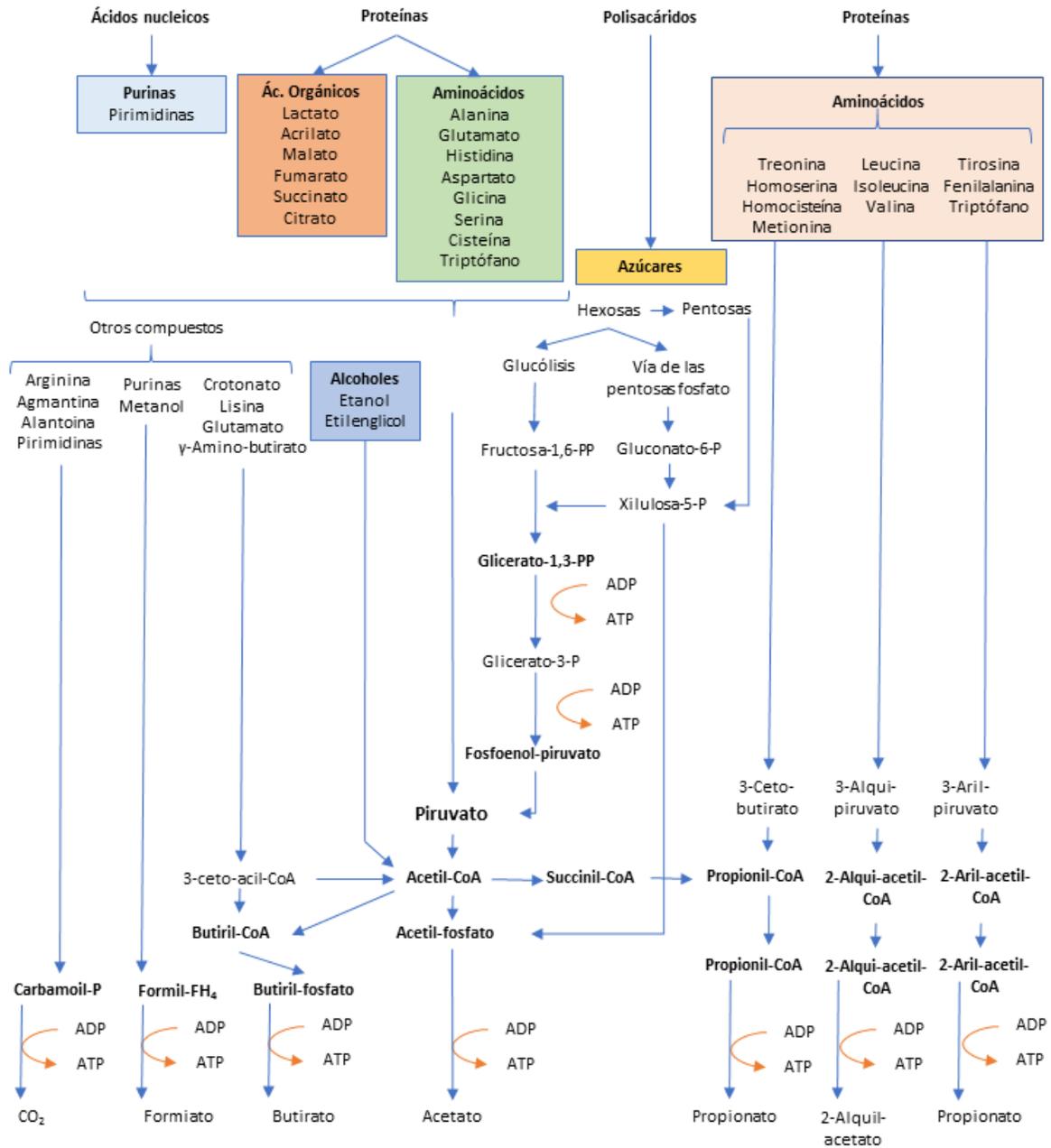
La producción de hidrógeno por las reacciones fermentativas es pequeña y se origina por la deshidrogenación del piruvato, asociada a la ferredoxina (Fd), que es un transportador de electrones de bajo potencial, en donde la transferencia de electrones de Fd a  $H^+$  se cataliza por la enzima llamada hidrogenasa; en donde la liberación de  $H_2$  funciona para mantener el equilibrio redox, debido al exceso de electrones (Madigan 2009; Grady et al. 2011; Ruggeri et al. 2015c).

Las bacterias anaerobias fermentativas utilizan rutas catabólicas de polisacáridos, aminoácidos y glicerol para la producción de glucosa, la cual puede ser utilizada en las rutas de fermentación alcohólica, láctica y acética. Como resultado de esta fermentación se obtienen alcoholes y ácidos grasos (Corrales et al. 2015).

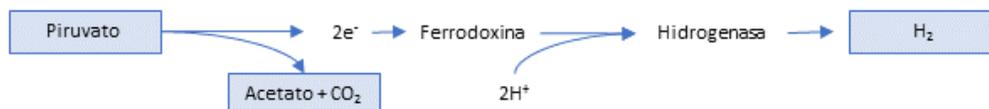
En esta fase, no se produce una reducción importante de la DQO, ya que lo que ocurre es la conversión de las moléculas orgánicas complejas en ácidos orgánicos de cadena corta que ejercen también una demanda de oxígeno (Ramalho 2003).

**Tabla 3.** Tipos de fermentación y productos originados (Corrales et al. 2015).

Tipo de fermentación	Producto
Fermentación láctica	Lactato
Fermentación alcohólica	Etanol, $CO_2$
Fermentación ácida-mixta	Etanol, Succinato, Acetato, Formiato, Lactato, $CO_2$ , $H_2$
Fermentación butilén-glicólica	Butilén-glicol, $CO_2$
Fermentación aceto-butírica	Acetato, Acetona, Butirato, Butanol, Etanol, $CO_2$ , $H_2$



**Figura 2.** Vías metabólicas de la descomposición anaerobia de la principal materia orgánica (Madigan 2009).



**Figura 3.** Producción de hidrógeno a partir del piruvato (Madigan 2009).

El consumo del H<sub>2</sub> durante la fermentación puede darse por 3 cadenas principalmente: 1) la reducción de sulfato y azufre a sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S); 2) acetogénesis y 3) metanogénesis, ya que ambos procesos están unidos a bombas de iones H<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup> (Madigan 2009).

Durante la metanogénesis, los electrones para la reducción del CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> proceden principalmente del H<sub>2</sub>.

### 4.3.3. Fase acetogénica

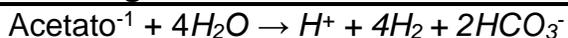
Durante esta fase, los ácidos grasos volátiles (AGV) son oxidados en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y ácido acético, el cual es producido por dos mecanismos: acetogénesis por hidrogenación, en la cual se produce acetato (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) como producto final de la reducción de CO<sub>2</sub> más H<sub>2</sub> y la acetogénesis por deshidrogenación en donde las bacterias son inhibidas por pocas cantidades de oxígeno (O<sub>2</sub>) y por lo tanto solo sobreviven en asociaciones con microorganismos que consumen hidrogeno como las bacterias homoacetogénicas (fermentación láctica) y bacterias sulfato reductoras (Corrales et al. 2015).

#### Reacciones acetogénicas

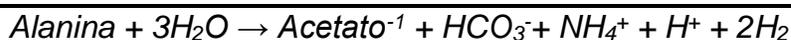
##### Etanol y láctico



##### Ácidos grasos



##### Aminoácidos



**Figura 4.** Reacciones que ocurren durante la acetogénesis.

Ejemplo de bacterias homoacetogénicas están el género *Acetobacterias* y *Clostridios* que crecen por la vía glicolítica de fermentación de azúcares en piruvato, que es transformado en acetato con formación de ATP, liberando CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. Esta producción

concomitante de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> es vital para abastecer las necesidades de fuente de carbono y electrones del resto de los grupos. Debido a su amplio consumo, el gradiente termodinámico se mantiene hacia la generación continua de hidrógeno molecular (Ferrer y Pérez 2010).

Gran parte del H<sub>2</sub> producido proviene de la oxidación de los AGV y los ácidos de cadena larga al convertirse en ácido acético, surgiendo de la transferencia de electrones desde los compuestos reducidos a iones de hidrógeno, en un proceso llamado oxidación anaerobia, la cual puede ser inhibida por presiones altas de H<sub>2</sub>, mientras que la producción de H<sub>2</sub> desde el piruvato no es afectada (Grady et al. 2011).

La producción de H<sub>2</sub> por oxidación anaerobia propicia el funcionamiento del proceso anaerobio debido a que es el principal sustrato para la formación de metano; además, si no fuera formado el H<sub>2</sub>, la acidogénesis no podría resultar en productos oxidados, siendo el ácido acético el mayor compuesto orgánico soluble; finalmente, si la formación de H<sub>2</sub> no ocurre y los compuestos orgánicos reducidos fueran formados, estos se acumularán en el líquido debido a que no pueden ser usados como sustrato para la formación de metano (Grady et al. 2011).

Es importante que los microorganismos acetogénicos colaboren con los microorganismos metanogénicos, ya que la oxidación de los AGV sólo puede ocurrir si la presión parcial de H<sub>2</sub> es baja, lo cual es crítico para la producción de metano debido a que se debe consumir el H<sub>2</sub> (Adekunle y Okolie 2015).

#### **4.3.4. Fase de metanogénesis**

Durante la metanogénesis, llamada también fermentación metánica, microorganismos metanogénicos que son estrictamente anaerobios, convierten los ácidos de cadenas más largas a metano, dióxido de carbono y ácidos orgánicos de cadenas más cortas. Las moléculas ácidas se rompen dando lugar a ácido acético que se convierte en CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> (Ramalho 2003).

Se ha identificado aproximadamente unas 90 especies de bacterias metanogénicas en 5 órdenes: *Methanobacteria*, *Methanococci*, *Methanomicrobiota*, *Methanopyri* y *Methanosarcinales*; las cuales encuentran en hábitats típicos como digestores

anaerobios, sedimentos anóxicos, suelos de humedales y tractos gastrointestinales (Corrales et al. 2015).

La formación de metano se da a partir de tres rutas, la primera, es la acetoclástica en la cual los microorganismos crecen principalmente en su sustrato (acetato); la segunda, es la hidrogenotrófica en donde los microorganismos crecen en sustratos como  $H_2$  y  $CO_2$ ; y la tercera, es la vía metilotrófica, en el que crecen los microorganismos en compuestos metilados como metanol, metilaminas y metilsulfuro, los cuales actúan como donantes o aceptores de electrones o son reducidos con  $H_2$ . (Ferrer y Pérez 2010; Adekunle y Okolie 2015; Corrales et al. 2015).

<b>Reacciones hidrogenotróficas</b>
$4H_2 + H^+ + 2HCO_3^- \rightarrow \text{Acetato} + 4H_2O$
$4H_2 + 4^{\circ} \rightarrow 4HS^- + 4H^+$
$4H_2 + 2HCO_3 + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$
$4H_2 + 2SO_3^{2-} + H^+ \rightarrow HS^- + 4H_2O$
$4H_2 + 4\text{fumarato} \rightarrow 4\text{succinato}$
$4H_2 + NO_3^- + 2H^+ \rightarrow NH_4^+ + 3H_2O$
<b>Interconversión formato-hidrógeno</b>
$H_2 + HCO_3^- \rightarrow \text{formato} + H_2O$
<b>Metanogénesis acetoclástica</b>
<i>Fórmico</i>
$4HCOOH \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O$
<i>Metanol</i>
$4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$
<i>Trimetil-amina</i>
$4(CH_3)_3N + 6H_2O \rightarrow 9CH_4 + 3CO_2 + 4NH_3$
<i>Dimetil-amina</i>
$2(CH_3)_2NH + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2NH_3$
<i>Monometil-amina</i>
$4(CH_3)NH_2 + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 4NH_3$

**Figura 5.** Principales reacciones metanogénicas.

En comparación con la digestión aerobia, la digestión anaerobia permite convertir gran cantidad de residuos en energía, al transformar la materia orgánica contaminante en metano, logrando eficiencias de remoción de 71-97 % de la DBO del agua residual (Ferrer y Pérez 2010).

Por ello, la actividad de bacterias anaeróbicas es utilizada para tratar aguas residuales con alta carga orgánica ( $\text{DBO} > 500 \text{ mg/L}$ ), y para el tratamiento de lodos del sistema convencional de tratamiento de aguas residuales, siendo un proceso bioquímicamente ineficiente y lento, con subproductos de mal olor (ácidos orgánicos y compuestos sulfurados), así como gases, principalmente metano ( $\text{CH}_4$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y pequeñas cantidades de sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ), mercaptano ( $\text{RSH}$ ) e hidrógeno ( $\text{H}_2$ ) (Ramalho 2003; Gray 2010).

#### **4.4. Factores que afectan la producción de hidrógeno**

La producción de hidrógeno a partir del tratamiento de múltiples residuos, ya sean agrícolas o industriales ricos en carbohidratos, es afectado por el uso de complejos sustratos orgánicos y la composición del inóculo que posee una amplia diversidad de microorganismos. Sin embargo, el incremento en la producción de hidrógeno dependerá de las condiciones de operación del reactor biológico en el pH, temperatura, presión de hidrógeno, diseño del reactor y la composición microbiana del inóculo (Kim et al. 2008; Guo et al. 2010).

##### **4.4.1. pH**

Las variaciones en el pH afectan los rendimientos en la producción de hidrógeno por alteraciones en la comunidad microbiana y en las rutas metabólicas (Dong et al. 2009; Guo et al. 2010).

Los microorganismos productores de hidrógeno (MPH) tienen un rango de tolerancia de 5-7 de pH, pero al ser sometidos a condiciones menores de pH 5 o mayores de pH 8, la producción de hidrógeno decrece por la inactivación de la deshidrogenasa (Kim et al. 2008; Chong et al. 2009).

En cuanto las rutas metabólicas, se ha descrito que la producción de hidrógeno en pH ácidos se favorece con la fermentación de butirato y etanol; mientras que la fermentación de propionato, butanol consume hidrógeno, reduciendo la eficiencia en la producción (Hwang et al. 2004).

#### **4.4.2. Temperatura**

Se reporta la utilización de temperaturas mesófilas y termófilas, dependiendo del tipo de residuo a fermentar para la producción de hidrógeno. Las anteriores temperaturas afectan las comunidades microbianas, ya que en temperaturas mesófilas predominan bacterias como *Bacteroides* spp., *Enterobacter* spp. y *Clostridium* spp., mientras en que temperaturas termófilas dominan *Caldoanaerobacter* spp. y *Thermophilic* spp. (Kim et al. 2008; Chong et al. 2009; Guo et al. 2010).

La principal desventaja de mantener la temperatura en la fermentación termófila son los costos asociado a la energía requerida para mantener el calor y el mantenimiento del sistema (Guo et al. 2010).

#### **4.4.3. Presión del hidrógeno**

La presión parcial de hidrógeno es reportada como un factor restrictivo en el proceso de la fermentación de los residuos. Debido a que la oxidación de los compuestos reducidos ocurre simultáneamente con la producción de hidrógeno se produce baja concentración de bio-hidrógeno en el medio al ser una reacción termodinámicamente desfavorable (Dong et al. 2009).

#### **4.4.4. Diseño y operación del reactor**

Muchos estudios sobre producción de hidrógeno en fermentación oscura han sido conducidos en reactores por lotes a escala en laboratorio (Kawagoshi et al. 2005; Mu et al. 2007; Ren et al. 2008; Wang y Wan 2008; Cai et al. 2009; Wang et al. 2011; Cai y Wang 2016) por su facilidad y flexibilidad de operación para determinar los requerimientos en nutrientes y producción de H<sub>2</sub> de algún sustrato en particular; pero en un contexto industrial, por razones prácticas del manejo y almacenamiento de los residuos, así como por consideraciones económicas, los reactores de flujo continuo son recomendados, para lo cual los reactores que se diseñen deben ser semejantes a los utilizados para producción de metano (Hawkes et al. 2007; Guo et al. 2010).

Chen et al. (2001) menciona que en reactores de flujo continuo, la producción de bio-hidrógeno es incrementada al operar a velocidades de dilución mayor a 0.075 h<sup>-1</sup>, debido al lavado de las MCH y a la permanencia de los MPH en el cultivo mixto.

Otros factores a tomar en cuenta en la operación de reactores de flujo continuo son el tiempo de retención hidráulico, pH, concentración del sustrato, temperatura (termófila o mesófila) y la reducción de la presión parcial de hidrógeno (Hawkes et al. 2007).

Lo anterior, tendrá impacto en la capacidad de producción de hidrógeno, ya que en condiciones de flujo continuo es posible producir más bio-hidrógeno, que en condiciones por lotes.

#### **4.4.5. Composición microbiana del inóculo**

Las comunidades microbianas en los lodos son diversas, conteniendo bacterias del tipo acetogénicas, acidogénicas, metanogénicas, consumidoras y productoras de hidrógeno. Para favorecer la producción de hidrógeno es necesario que sean eliminados los MCH del consorcio microbiano, para que se favorezca la presencia de microorganismo productores de hidrógeno como *Clostridium* spp., *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., y *Thermophilic* spp. (Kim et al. 2008; Chong et al. 2009; Morales et al. 2015; Cai y Wang 2016), para lo cual se han propuesto tratamientos consistentes en la aplicación de choques térmicos, soluciones ácido-base, aireación, congelamiento y descongelamiento, aplicación de cloroformo, iodopropano y sodio 2-bromoetanosulfato (Wang y Wan 2008; Reyhani y Zilouei 2013; Cai y Wang 2016).

De los anteriores factores, los estudios sobre cómo modificar la composición microbiana del inóculo han sido de interés debido a que es un factor que no es complejo en la operación y que es relativamente más económico que los anteriores.

#### **4.5. Inhibición de MCH en el inóculo**

El principal objetivo de utilizar pretratamientos en el consorcio microbiano es inactivar las bacterias consumidoras de hidrógeno, para favorecer la presencia las bacterias productoras de hidrógeno y utilizarla como inóculo dentro los reactores.

#### **4.5.1. Soluciones ácido-base**

Al inóculo se le aplica un pretratamiento ácido-base, los cuáles son expuestos en diferentes tiempos, para luego ser ajustado a un pH neutro; con lo cual se logrará la permanencia de bacterias productoras de hidrógeno al ser estas tolerantes a ambientes extremos (Kawagoshi et al. 2005; Cai et al. 2009).

Lin et al. (2011) al evaluar la producción de hidrógeno en sustratos de fructuosa y melaza (proveniente de residuos vegetales) usando cultivo mixto pretratado a diferentes rangos de pH (4-8) en un reactor por lotes a temperatura constante de 55 °C, obtuvo que la mayor producción de bio-hidrógeno en el gas (43 % en fructuosa y 52 % en melaza) se consiguió a un pH de 6, al ser favorecido la presencia de *Clostridium* spp. y *Bacillus* spp.

#### **4.5.2. Congelación y descongelamiento**

Consiste en someter a los microorganismos contenidos en el lodo residual a temperaturas de congelamiento, reportándose temperaturas de -10 a -17 °C durante 24 horas, para luego ser descongelados en agua tibia en un rango de temperaturas de 25-30 °C durante tiempos de 12-24 horas (Wang et al. 2003a; Mohammadi et al. 2012).

Wang et al. (2003b) mencionan que el uso del pretratamiento de congelación y descongelación aumenta la producción de hidrógeno de 0.6 mmol H<sub>2</sub>/g-DQO (sin uso del pretratamiento) a 1.5 mmol H<sub>2</sub>/g-DQO.

#### **4.5.3. Ultrasonificación**

Entre la diversidad de materiales y sustratos para ser utilizados como fuentes de combustibles, aquellos sustratos con paredes celulares resistentes (algas, restos vegetales), deben ser sometidos a un pretratamiento de ultrasonificación para causar la lisis de las paredes celulares y con ello, permitir la disponibilidad de su contenido celular en el medio, ya que la pared celular es resistente a la biodegradación por fermentación bacteriana. Esta ultrasonificación consiste en el uso de ondas con frecuencias desde 20 kHz hasta un máximo de 2.2 kW, durante tiempos de 20-60 min, obteniendo eficiencias de producción de bio-hidrógeno de 5-10 % en el gas, al aplicar ultrasonificación a microalgas (Wang et al. 2003a; Choi et al. 2011).

Wongthanate et al. (2014) reportaron que la aplicación de ultrasonificación a residuos de restaurantes y residuos ricos en almidón, se obtuvieron rendimientos de 2.09 mL H<sub>2</sub>/g DQO y 1.43 mL H<sub>2</sub>/g DQO respectivamente.

#### **4.5.4. Choques térmicos**

La aplicación de choques térmicos es una forma fácil y efectiva de inactivar los MCH en el consorcio microbiano, además de obtener mejores rendimientos en la producción de hidrógeno a comparación de los otros pretratamientos (Kawagoshi et al. 2005; Cai et al. 2009). Esta efectividad se debe a que las altas temperaturas causan rupturas de las paredes y membranas celulares, solubilización de los componentes celulares y deterioro de las proteínas microbianas (Appels et al. 2008). Sólo aquellas bacterias capaces de formar esporas logran sobrevivir al choque térmico, como *Clostridium* spp., la cual es un microorganismo productor de hidrógeno (Wang y Yin 2017).

Diversos estudios han reportado el efecto de temperaturas en un rango de 60-100 °C con tiempo de exposición de 5-120 min (Kawagoshi et al. 2005; Mu et al. 2007; Ren et al. 2008; Cai et al. 2009; Cai y Wang 2016), obteniendo los mejores resultados a temperaturas 60-80 °C y tiempos de exposición entre 15-20 min. Estos estudios han tenido amplia diversidad en los resultados debido a la fuente del inóculo y al tipo de residuo utilizado.

#### **4.6. Aplicación del pretratamiento térmico a consorcios microbianos.**

Kawagoshi et al. (2005) analizaron seis fuentes de inóculo, siendo estos lodo activado de una planta de tratamiento aeróbica de aguas residuales, lodo de un digestor anaerobio, suelo de un campo de sandía, suelo de un cultivo de kiwi, sedimento de un lago, y composta de desperdicios aerobios. Cada uno de estos inóculos fue sometido a dos tipos de tratamiento e inoculados en un reactor por lotes con un medio rico en glucosa. El primero fue un tratamiento térmico de 100 °C durante 2 h, mientras que el segundo tratamiento consistió en diferentes pH iniciales en un rango de 5 a 7. Los mejores resultados en producción de hidrógeno (1.4 mol H<sub>2</sub>/mol de glucosa<sub>eliminada</sub>) se obtuvieron del inóculo proveniente del lodo de un digestor anaerobio con tratamiento térmico, superando ampliamente a aquellos inóculos que recibieron únicamente pretratamiento ácido (0.8 mol H<sub>2</sub>/mol de glucosa<sub>eliminada</sub>).

Mu et al. (2007) realizaron un experimento similar al anterior mencionado, con la diferencia de haber utilizado un inóculo proveniente de un reactor anaerobio de flujo ascendente para aguas residuales de grano de soya. El inóculo fue pretratado por método térmico (100 °C por 2 h), ácido (pH 3–4 durante 24 h) y alcalino (pH 12 durante 24 h), bajo condiciones por lotes con glucosa como sustrato. Los resultados mostraron que la mayor producción de hidrógeno (2.0 mol H<sub>2</sub>/mol de glucosa) se logró mediante el pretratamiento térmico, seguido por el pretratamiento ácido (1.3 mol H<sub>2</sub>/mol de glucosa<sub>eliminada</sub>) y alcalino (0.48 mol H<sub>2</sub>/mol de glucosa<sub>eliminada</sub>).

Ren et al. (2008) utilizaron cuatro métodos de inhibición de los MCH, aplicando pretratamiento térmico (102 °C por 90 min), ácido (pH 3 durante 24 h), alcalino (pH 11 durante 24 h) y aireación extendida (<0.5 mg/L de oxígeno disuelto durante 24 h), en un lodo proveniente de aguas residuales municipales, bajo un proceso por lotes. La mejor producción de hidrógeno (224.5 mL/reactor 150 mL) se logró con la aireación extendida, el cual permitió la mayor actividad y sobrevivencia de bacterias acetogénicas con simultánea muerte de MCH; en cambio, el pretratamiento térmico obtuvo la segunda mayor producción de hidrógeno (189.5 mL/reactor 150 mL), pero con la desventaja de tener menor diversidad de MPH.

Wang y Wan (2008) investigaron la producción de hidrógeno utilizando el lodo de un digestor anaerobio de tratamiento de aguas residuales, al cual sometieron a cinco métodos de inhibición bajo condiciones por lotes. Como métodos se usó el pretratamiento térmico (100 °C durante 15 min), ácido (pH 3 durante 24 h), alcalino (pH 10 durante 24 h), aireación extendida, y aplicación de cloroformo al 2 % durante 24 h. El pretratamiento térmico mostró ser el mejor en la producción máxima de hidrógeno (215.4 mL/reactor 150 mL) con una eficiencia del 46 % de conversión y el que produjo mayor biomasa (2739 mg/L), mientras que el pretratamiento con aireación ocupó el cuarto lugar en producción de hidrógeno (80.2 mL/reactor 150 mL) con 21 % de eficiencia, a diferencia del estudio de Ren et al (2008), en el que fue el mejor pretratamiento.

Cai et al. (2009) aplicaron pretratamiento térmico (100 °C por 90 min), ácido (pH 3 por 30 min), alcalino (pH 10 por 30 min), y nitrato de potasio (10 mmol KNO<sub>3</sub>/L) a un lodo

marino en condiciones por lotes con sacarosa como sustrato. El tratamiento térmico obtuvo los mejores resultados en producción acumulada (1240 mL/L) y tasa de producción de hidrógeno (27.5 mL/L\*h), seguido por el pretratamiento con KNO<sub>3</sub> (acumulado de 850 mL/L y una tasa de 19.3 mL/L\*h).

Valdés et al. (2009) evaluaron el efecto de la temperatura de incubación y la adición de germinadores (nutrientes específicos para la germinación de esporas), para lo cual utilizó un reactor por lote, aplicando un pretratamiento térmico de 93 °C durante 60 min a un lodo de una planta de tratamiento municipal, el cual se inoculó en un agua residual municipal. La mayor producción de hidrógeno se alcanzó con la adición de L-alanina como germinador, sin importar la temperatura de incubación, con un acumulado de 740 mL H<sub>2</sub>/reactor.

Wang et al. (2011) estudiaron la influencia de diversos pretratamientos para eliminar los MCH de un lodo proveniente de un reactor anaerobio de excretas porcinas y determinar cuál es más eficiente en la producción de hidrógeno. Como pretratamientos utilizaron el térmico (temperaturas de 80, 90 y 100 °C en dos periodos de 15 y 30 min), alcalino (pH 9-11 durante 3h), y ácido (pH 2-4 durante 3 h) bajo condiciones por lotes con glucosa como sustrato. La mayor producción de hidrógeno se logró con el tratamiento térmico, en el que la aplicación de 80 °C durante 30 min produjo 2152.0 mL/reactor 500 mL con una conversión de 448.3 mL H<sub>2</sub>/g DQO y un contenido del 70 % de hidrógeno en el gas. El mejor pretratamiento alcalino (pH 10) produjo 2061.6 mL/reactor 500 mL con una conversión de 429.5 mL H<sub>2</sub>/g DQO y contenido del 46.9 % de hidrógeno en el gas. Por el último, el pretratamiento ácido (pH 4) produjo 1909.8 mL/reactor 500 mL con una conversión de 397.9 mL H<sub>2</sub>/g DQO y contenido del 61.5 % de hidrógeno en el gas.

Bansal y Sreekrishnan (2013) estudiaron la producción de hidrógeno utilizando residuo vegetal de cocina, inoculado con un cultivo mixto proveniente de estiércol porcino, al cual se le aplicó diversos pretratamientos térmicos en un rango de 50-100 °C con un tiempo de 20 min, bajo condiciones por lotes. La máxima producción de hidrógeno (3.44 mL H<sub>2</sub>/g residuo vegetal en peso seco) se logró con el pretratamiento a 100 °C,

logrando un 98.80 % del gas total; mientras que la producción de hidrógeno en el gas fue del 17.70 % cuando no se pretrató el inóculo.

Cai y Wang (2016) probaron tres métodos de inhibición de MCH, térmico (100 °C por 30 min), ácido (pH 3 por 30 min) y alcalino (pH 10 por 30 min), en un lodo marino en condiciones por lotes con sacarosa como sustrato. Como mucho de los anteriores experimentos, el pretratamiento térmico produjo la mayor cantidad de hidrógeno (75.5 mL/g sacarosa<sub>eliminado</sub>), mientras que en el pretratamiento ácido y alcalino fue de 43.4 mL/g sacarosa<sub>eliminado</sub> y 26 mL/g sacarosa<sub>eliminado</sub>, respectivamente.

A pesar de sus los altos porcentajes de bio-hidrógeno en el gas, el tratamiento por choque térmico en el inóculo a escala industrial puede ser una técnica dificultosa a comparación de otros tratamientos, como el uso de tratamiento ácido-base, por lo que será importante determinar si mejora la producción de hidrógeno en la práctica (Hawkes et al. 2007).

De acuerdo con la literatura revisada, el tratamiento térmico favorece una mayor producción de hidrógeno, cuya eficiencia de conversión y concentración en el gas dependerá de la fuente del inóculo, el sustrato, la temperatura y el tiempo de aplicación. En el contexto local, las granjas porcícolas, las plantas de tratamiento de agua municipal y las granjas bovinas, son una fuente importante como inóculo, el cual debe ser evaluado en residuos ricos en carbohidratos, como las aguas residuales de industrias alimenticias. Dada esta situación, es necesario evaluar la temperatura y tiempo de aplicación a los inóculos antes mencionados para su potencial uso en la generación de bio-hidrógeno.

## Capítulo 3

### 5. Metodología

#### 5.1. Origen del inóculo y aplicación choque térmico

Se usaron tres tipos de inóculos como fuente de microorganismos anaerobios: lodo anaerobio municipal, lodo anaerobio porcino, y líquido ruminal bovino. El lodo anaerobio municipal se obtuvo de la PTAR “Las Américas I”, ubicado en el Fraccionamiento Las Américas del municipio de Mérida, Yucatán; administrado por la Junta de Agua Potable y Alcantarillado de Yucatán (JAPAY). El lodo anaerobio porcino se colectó del interior de un biodigestor anaerobio tipo laguna cerrada de aguas residuales porcícolas, localizado en la localidad de Sierra Papacal del municipio de Mérida. Por último, el líquido ruminal bovino se adquirió en el rastro municipal de Mérida.

Las muestras fueron almacenadas a 4 °C al momento de ser trasladadas al laboratorio. Previo a la caracterización de los inóculos, las muestras fueron descongeladas hasta alcanzar temperatura ambiente. Los materiales utilizados como inóculos fueron caracterizados en su contenido de sólidos totales (ST), sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), carbono orgánico total soluble (COT<sub>s</sub>), y demanda química de oxígeno de la parte soluble (DQO<sub>s</sub>), de acuerdo a los métodos establecidos por APHA-AWWA-WPCF (2012). Además, se analizó su composición elemental de C, H, y N en un analizador elemental orgánico (OEA, por sus siglas en inglés) ThermoScientific Flash 2000.

Cada inóculo recibió un pretratamiento térmico de 105 °C durante 24 h con el propósito de inactivar los microorganismos consumidores de hidrógeno y permitir el crecimiento de las productoras de hidrógeno (Moreno et al. 2015).

#### 5.2. Preparación de las unidades experimentales

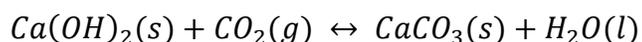
Cada unidad experimental consistió en una botella serológica de 120 mL, selladas con una tapa de goma y un aro de aluminio. Por cada botella se dejó un espacio de cabeza de 40 mL y se utilizó un volumen de 80 mL para el contenido del reactor.

Para la preparación de cada reactor, se añadió 5 mL de una solución mineral consistente en 2600 mg/L NH<sub>4</sub>Cl, 250 mg/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 125 mg/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 5 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2.5 mg/L CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2.5 mg/L MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 2.5 mg/L KI, 0.5 mg/L H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 0.5 mg/L NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O y 0.5 mg/L ZnCl<sub>2</sub> (Mizuno et al. 2000). Luego se agregó sustrato e inóculo en una relación 4:1 (Dhar et al. 2015), utilizando como sustrato 1.504 g de sacarosa anhidra (equivalentes a 1.6 g DQO) con 0.4 g de SSV de inóculo pre-tratado. Posteriormente se aforó a 80 mL con agua destilada, y se ajustó el pH a 5.5 (Khanal et al. 2004) utilizando 1 M de HCl. Por último, las botellas fueron purgadas con nitrógeno gaseoso durante 30 segundos para permitir un medio anóxico (Wang et al. 2011).

El contenido de la botella fue incubado a 37 °C y agitado a 150 rpm para proveer el mejor contacto entre el sustrato y el consorcio microbiano del inóculo (Kawagoshi et al. 2005; Cai y Wang 2016). La cantidad de gas producido fue medida por el método de desplazamiento de líquido (Mu et al. 2007; Cai et al. 2009; Cai y Wang 2016), siendo almacenado el biogás en una botella invertida con una solución saturada de sal (30 g/L) y acidificada (pH<2), con el fin de asegurar que ninguna fracción de CO<sub>2</sub> atmosférico se disuelva en el líquido de la botella invertida utilizado para medir la producción de biogás.

Adicional a la botella del reactor y a la botella invertida, se colocaron entre ellas dos botellas trampa de CO<sub>2</sub>, con el fin de medir indirectamente la cantidad de CO<sub>2</sub> generado y de permitir que, en las botellas almacenadoras de biogás, haya mayor concentración de hidrógeno. Cada botella trampa contuvo 100 mL de una solución acuosa saturada de Ca(OH)<sub>2</sub>, la cual se preparó con 0.7383 g de Ca(OH)<sub>2</sub> en 500 mL de agua destilada y posteriormente filtrada (Han et al. 2011).

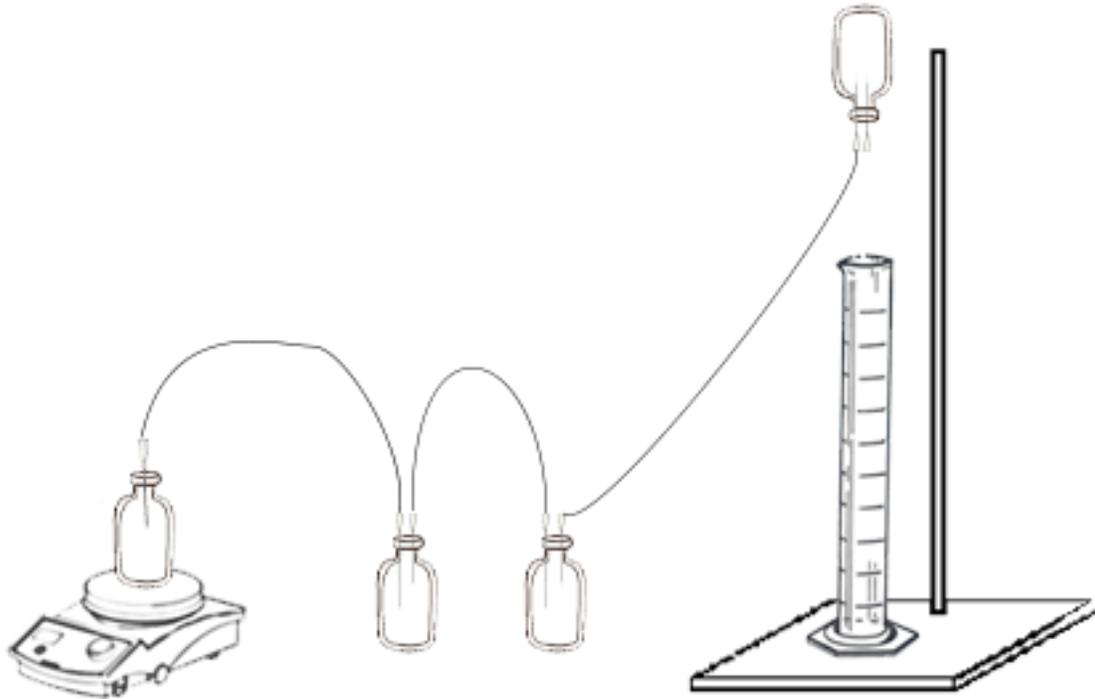
La reacción general para la captura de CO<sub>2</sub> usando una solución acuosa saturada de Ca(OH)<sub>2</sub> se expresa a continuación:



La hora de inicio de cada reactor, se tomó al momento de la purga de aire con el nitrógeno gaseoso; estableciendo el fin de la prueba después de 40 horas de

operación, debido a que en ese tiempo la curva de producción de biogás se vuelve asintótica, procediendo al paro del experimento (Moreno-Andrade y Buitrón 2004).

El montaje de los reactores se presenta en la Figura 6.



**Figura 6.** Esquema del montaje de los reactores en condición por lotes.

### **5.3. Métodos analíticos**

#### **5.3.1. Composición del biogás**

Se analizó la concentración de hidrógeno en el biogás por medio de un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer Clarus 500) provisto de un detector de conductividad térmica (CG-TCD). La temperatura del inyector, detector y columna (Elite-Molesieve 30 m x 0.53 mm ID) fueron de 50 °C, 150 °C y 50 °C respectivamente. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 30 mL/min.

Para evaluar la respuesta de producción de biogás e hidrógeno en las diferentes condiciones, se aplicó el análisis cinético de Gompertz (Buitrón y Carvajal 2010; Ramos et al. 2012; Moreno 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) (mg/L) es el volumen total del gas acumulado en el tiempo t(h); Hmax (mg/L<sub>reactor</sub>) es el máximo volumen de gas acumulado (mL); Rmax (ml/L<sub>reactor</sub>) es la máxima tasa de producción de gas (mL/h); y λ(h) es el tiempo de fase de latencia.

La concentración de metano fue analizada en un cromatógrafo de gases (Thermo Scientific - Trace GC Ultra), provista de una columna Innowax (30 m x 0.25 ID x 0.25 μm), junto con un detector de ionización de llama (CG-FID, por sus siglas en inglés) a una temperatura base de 280 °C. Se operó el equipo en manual, inyectando una muestra de 1 mL de biogás, utilizando un inyector vaporizador con temperatura programada PTV, 150 °C; flujo Split (30 mL/min); helio (He) como gas acarreador, a un flujo de 1.1 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; horno de rampa isotérmica, 50 °C por 4 min.

### 5.3.2. Caracterización de los subproductos de la fermentación

A las 40 h de operación, se abrió cada reactor y se registró el valor del pH. Se agitó la botella y se tomaron muestras del contenido para determinar COTs y DQOs conforme lo establecido por APHA-AWWA-WPCF (2012).

El resto del contenido del reactor fue centrifugado a 3800 rpm durante 15 min para separar los sólidos y recuperar la fracción soluble para determinar los ácidos grasos volátiles (Ác. Acético, Ác. Butírico, Ác. Propiónico) productos de la fermentación. La fracción soluble fue filtrada y luego acidificada a un pH<2 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 3 % (Adorno et al. 2014), para su almacenamiento y posterior análisis.

Para el análisis de ácidos grasos volátiles (AGV) de cada muestra, se colocó en un vial de 10 mL con tapa de teflón (Adorno et al. 2014), una alícuota de 2 mL (previamente acidificada), al cual se añadieron 1 g de NaCl, 70 μl de ácido isopropílico, 100 μL de ácido heptanoico (como estándar interno), y 200 μL de HCl 2M.

La determinación de AGV se realizó mediante un cromatógrafo de gases (Thermo Scientific - Trace GC Ultra) con una columna Innowax (30 m x 0.25 ID x 0.25 μm),

equipado con un FID y una jeringa de inyección automática de 1000  $\mu\text{L}$ . Se utilizó la técnica “headspace”.

Las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura del puerto de inyección, 250  $^{\circ}\text{C}$ ; volumen inyección, 10  $\mu\text{L}$ ; flujo “split” 50 mL/min; modalidad automática de inyección; detector de temperatura, 280  $^{\circ}\text{C}$ ; He como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min; gas  $\text{H}_2$  con un flujo de 35 mL/min; flujo de aire, 350 mL/min;  $\text{N}_2$  como gas portador con flujo de 25 mL/min. El equipo fue programado para calentar el horno a 50  $^{\circ}\text{C}$  (1 min), de 50-140  $^{\circ}\text{C}$  a 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , 140  $^{\circ}\text{C}$  por un 1 min, 140-220  $^{\circ}\text{C}$  a 30  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , y 220  $^{\circ}\text{C}$  por 1 min.

#### 5.4. Diseño experimental

Se aplicaron 6 tratamientos (Tabla 4) consistentes en tres fuentes inóculos con pretratamiento térmico y tres controles (inóculo sin pretratamiento térmico). Cada tratamiento contó con tres réplicas, teniendo un total de 18 unidades experimentales.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con dos factores sin interacción. Los datos fueron analizados por comparación de varianzas (ANOVA) de dos vías para determinar la significancia del efecto del inóculo y del efecto del pretratamiento térmico. Se utilizó el contraste múltiple de medias a través del método de Duncan para comparar entre los niveles de un mismo factor. El análisis estadístico para la comparación de medias se realizó con el software STATGRAPHICS XVI CENTURIUN.

**Tabla 4.** Propuesta del diseño experimental.

Tratamiento	Inóculo	Pretratamiento
LC	Lodo anaerobio municipal	Control
LT		Choque térmico
PC	Lodo anaerobio porcino	Control
PT		Choque térmico
RC	Líquido ruminal	Control
RT		Choque térmico

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Caracterización del inóculo

El líquido ruminal presentó la mayor cantidad de sólidos, COT<sub>s</sub> y DQO<sub>s</sub> entre los inóculos, lo anterior derivado por la presencia de fibras vegetales, materia orgánica solubilizada (AVG > 7000 mg/L) y la posible alta cantidad de microorganismos relacionada a las poblaciones de microorganismos dentro del rumen bovino (Ransom-Jones et al. 2012; Huo et al. 2013; AlZahal et al. 2017; Wu et al. 2017).

**Tabla 5.** Composición física y química de los inóculos utilizados.

Características	Inóculo		
	Lodo anaerobio municipal	Líquido ruminal	Lodo anaerobio porcino
ST (mg/l)	19,145	63,400	17,995
SST (mg/l)	18,653	45,900	17,100
SSV (mg/l)	12,373	42,300	11,050
% C	46.32	27.96	27.62
% N	0.44	3.30	5.25
% H	0.56	3.54	4.63
C: N	104:1	9:1	6:1
CTs (mg/l)	170	8,412	106
CITs (mg/l)	124	132	22
COT <sub>s</sub> (mg/l)	46	8,280	84
DQO <sub>s</sub> (mg/l)	684	39,518	498

ST (sólidos totales), SST (sólidos suspendidos totales), SSV (sólidos suspendidos volátiles, C (carbono), N (nitrógeno), H (hidrógeno), CT<sub>s</sub> (carbono total soluble), CIT<sub>s</sub> (carbono inorgánico total soluble), COT<sub>s</sub> (carbono orgánico total soluble), DQO<sub>s</sub> (demanda química de oxígeno soluble).

Se ha reportado (Werle y Dudziak 2014; Singh et al. 2017) que el lodo anaerobio municipal presenta en su composición elemental un 21-38 % de carbono, 1-5 % de nitrógeno y 3-10 % de hidrógeno en plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) municipales de Estados Unidos e India; que en comparación a los datos obtenidos, se presenta un mayor porcentaje de carbono, pero menor porcentaje de nitrógeno e hidrógeno. Además, la concentración de COT<sub>s</sub> se encuentra dentro del rango reportado por Pehlivanoglu et al. (2007) que va de 45-375 mg/L; mientras que el menor contenido de COT<sub>s</sub> en comparación al CIT<sub>s</sub> es explicado por el porcentaje de

carbono orgánico presente en los lodos residuales municipales que va de 25-30 % (Giovannini et al. 1985).

El lodo anaerobio porcino, a pesar de tener una cantidad de sólidos semejante al lodo anaerobio municipal, no corresponde a sus valores de operación ya que se espesó el lodo para obtener suficiente cantidad de sólidos para inocular los reactores. De acuerdo a un estudio de Blanco et al. (2015), un digestor anaerobio porcino de tipo laguna en Yucatán presenta SSV de 660 a 4080 mg/L. Con respecto al COT<sub>s</sub> y DQOs, estos se encuentran dentro los rangos reportados por Ducey y Hunt (2013), de 79-930 mg/L y 79-1430 mg/L respectivamente, cuyos valores dependerán del tipo de reactor, operación, tiempo de retención hidráulica y de sólidos, carga orgánica volumétrica y de la profundidad del muestreo.

## 6.2. Caracterización del biogás

### 6.2.1. Producción de biogás

El volumen de biogás y dióxido de carbono se ve afectado por la aplicación del choque térmico y por el tipo de inóculo; en donde el choque térmico aumenta el volumen de biogás y de dióxido de carbono, mientras que el líquido ruminal es el único inóculo que afecta de forma negativa las anteriores dos variables (Tabla 6).

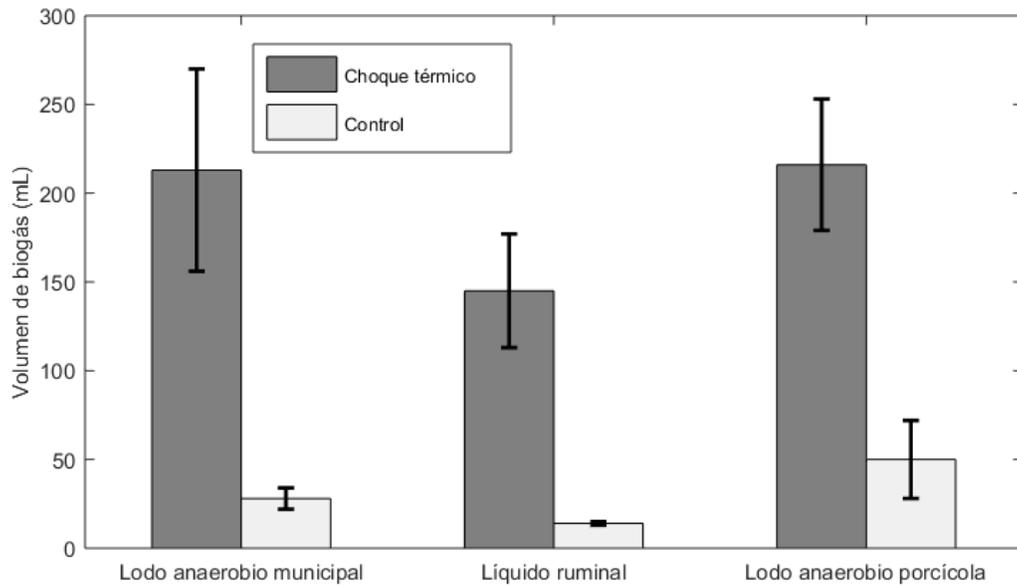
**Tabla 6.** Efecto del pretratamiento y el tipo de inóculo en el volumen biogás y CO<sub>2</sub>.

Pretratamiento	Inóculo	Biogás total (mL)	CO <sub>2</sub> capturado (mL)
Control	Lodo anaerobio municipal (LC)	27.67 ± 6.35 a	2.51 ± 0.48 ab
	Lodo anaerobio porcino (PC)	49.67 ± 22.28 a	6.91 ± 4.44 a
	Líquido ruminal (RC)	14.33 ± 1.15 a	0.69 ± 0.16 b
Choque térmico	Lodo anaerobio municipal (LT)	212.67 ± 56.45 b	40.57 ± 1.88 c
	Lodo anaerobio porcino (PT)	216.33 ± 36.53 b	42.21 ± 2.13 c
	Líquido ruminal (RT)	145.33 ± 31.53 c	39.44 ± 4.34 c

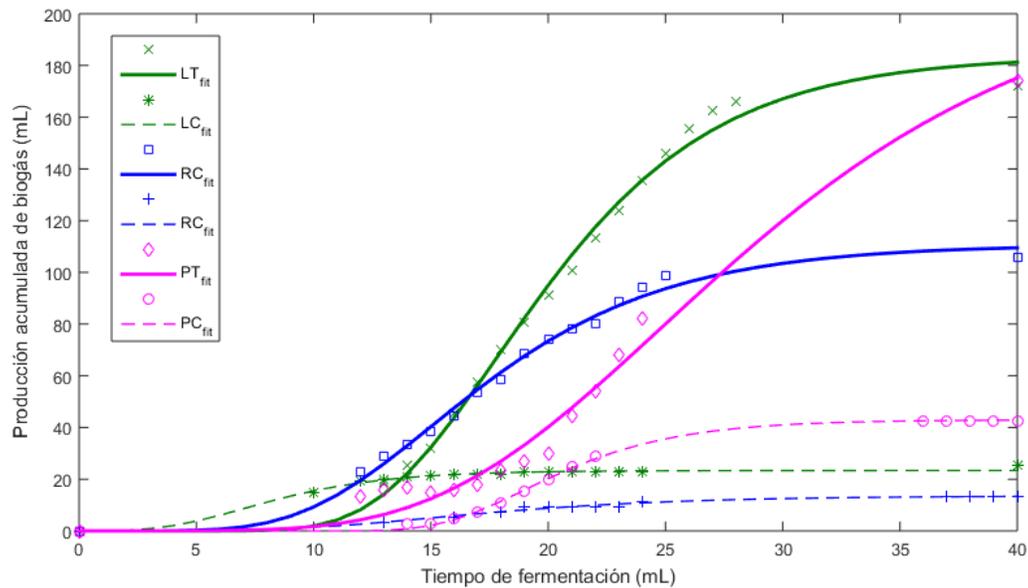
Nota: Literales en cada media señalan diferencias estadísticas según la prueba de Duncan con  $\alpha=0.05$ , en el que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias.

En la Figura 7 se puede observar que el uso de lodo anaerobio municipal y lodo anaerobio porcino con aplicación del choque térmico produjeron el mayor volumen promedio del biogás, ambas con igualdades estadísticas, a comparación del líquido ruminal que presentó el menor volumen de biogás. Cabe señalar que la aplicación del

choque térmico favoreció un sustancioso incremento en el volumen de dióxido de carbono capturado.



**Figura 7.** Volumen acumulado de biogás de acuerdo con el pretratamiento y tipo de inóculo.



**Figura 8.** Comportamiento cinético en la producción de biogás.

En la Figura 8 se presenta el comportamiento cinético de la producción de biogás, de acuerdo con el modelo de Gompertz, en donde los inóculos con aplicación de choque térmico presentaron un rango de tiempo de latencia de 8-15 h, así como un pico de producción durante las 20-30 h de operación, y una disminución de la producción de biogás a partir de las 30 h hasta alcanzar una producción asintótica a las 40 h. Se manifestó un distinto comportamiento en los inóculos sin pretratamiento al obtenerse un tiempo de latencia más amplio (3-15 h), así como un pico de producción (10-20) y tiempo de producción asintótica (20 h en dos inóculos) más temprano en ambos casos.

Por un lado, en la Tabla 7 se muestran los coeficientes cinéticos de Gompertz en aquellos inóculos expuestos al choque térmico, los cuales presentaron un volumen máximo de producción de biogás, una tasa máxima de rendimiento y tiempo de fase de latencia estimado de 183.76 mL, 13.10 mL/h y 12.69 h para el lodo anaerobio municipal; 213.96 mL, 8.36 mL/h y 15.43 h para el lodo anaerobio porcino; y 110.72 mL, 7.33 mL/h y 9.50 h para el líquido ruminal. Por el otro lado, los inóculos sin pretratamiento presentaron coeficientes similares en la producción máxima (13-42 mL) y rendimiento de biogás (0.8-4.4 mL/h), excepto por el amplio rango del tiempo de latencia (3.6-15.3 h).

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

Pretratamiento	Inóculo	$B_{max}$ (mL biogás)	$R_{max}$ (mL biogás/h)	$\lambda$ (h)
Control	Lodo anaerobio municipal (LC)	23.36	2.56	3.64
	Lodo anaerobio porcino (PC)	42.95	4.40	15.39
	Líquido ruminal (RC)	13.55	0.83	8.96
Choque térmico	Lodo anaerobio municipal (LT)	183.76	13.10	12.69
	Lodo anaerobio porcino (PT)	213.96	8.36	15.43
	Líquido ruminal (RT)	110.72	7.33	9.50

Nota: Literales en cada media señalan diferencias estadísticas según la prueba de Duncan con  $\alpha=0.05$ , en el que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias.

Un semejante comportamiento cinético del biogás obtuvieron Mu et al. (2007) al aplicar choque térmico en un lodo anaerobio municipal de tipo UASB, en el que el tiempo de activación se presentó en un rango 10-15 h con un pico de producción a las 20-30 h de operación.

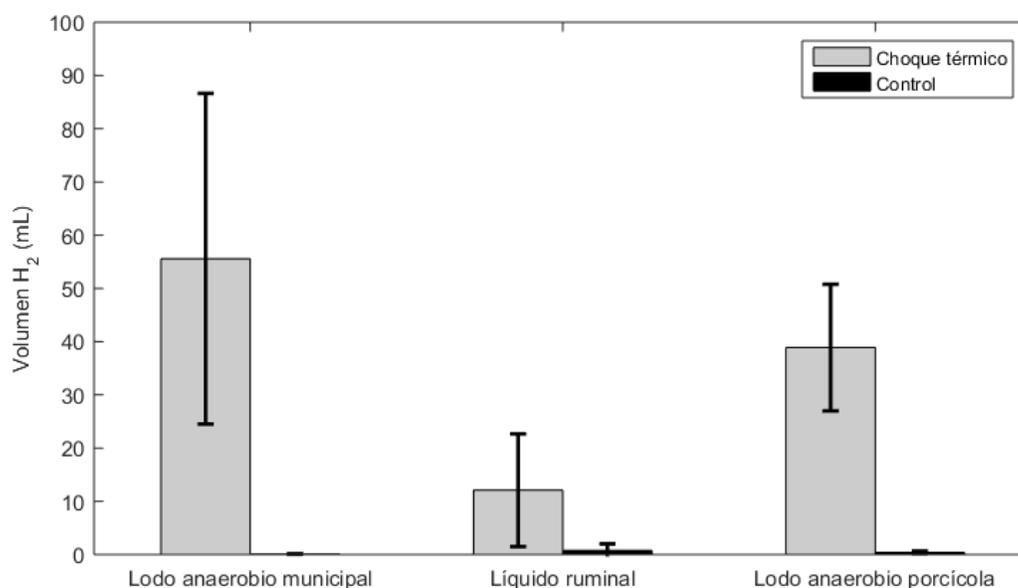
## 6.2.2. Producción de hidrógeno y metano

La aplicación del choque térmico aumentó estadísticamente el volumen de hidrógeno en comparación al grupo control ( $p < 0.05$ ), en las cuales la producción fue cercana a cero. Lo anterior refleja la efectividad del pretratamiento por choque térmico en la inactivación o inhibición de bacterias consumidoras de hidrógeno, como las metanógenas, reflejándose en la nula producción de metano (Tabla 8). La ausencia de metano es consistente en diversos estudios en los que la actividad de las metanogénicas fue suprimida por aplicación de un pretratamiento (Mu et al. 2007; Ren et al. 2008; Cai y Wang 2016).

**Tabla 8.** Efecto del pretratamiento y el tipo de inóculo sobre el volumen de hidrógeno y metano.

Pretratamiento	Inóculo	H <sub>2</sub> (mL)	CH <sub>4</sub> (mL)
Control	Lodo anaerobio municipal (LC)	0.10 ± 0.03 a	0.30 ± 0.20 a
	Lodo anaerobio porcino (PC)	0.39 ± 0.25 a	0.00 ± 0.00 a
	Líquido ruminal (RC)	0.78 ± 1.23 a	0.00 ± 0.00 a
Choque térmico	Lodo anaerobio municipal (LT)	55.58 ± 31.07 b	0.18 ± 0.32 a
	Lodo anaerobio porcino (PT)	38.90 ± 11.91 b	0.00 ± 0.00 a
	Líquido ruminal (RT)	12.09 ± 10.54 a	0.00 ± 0.00 a

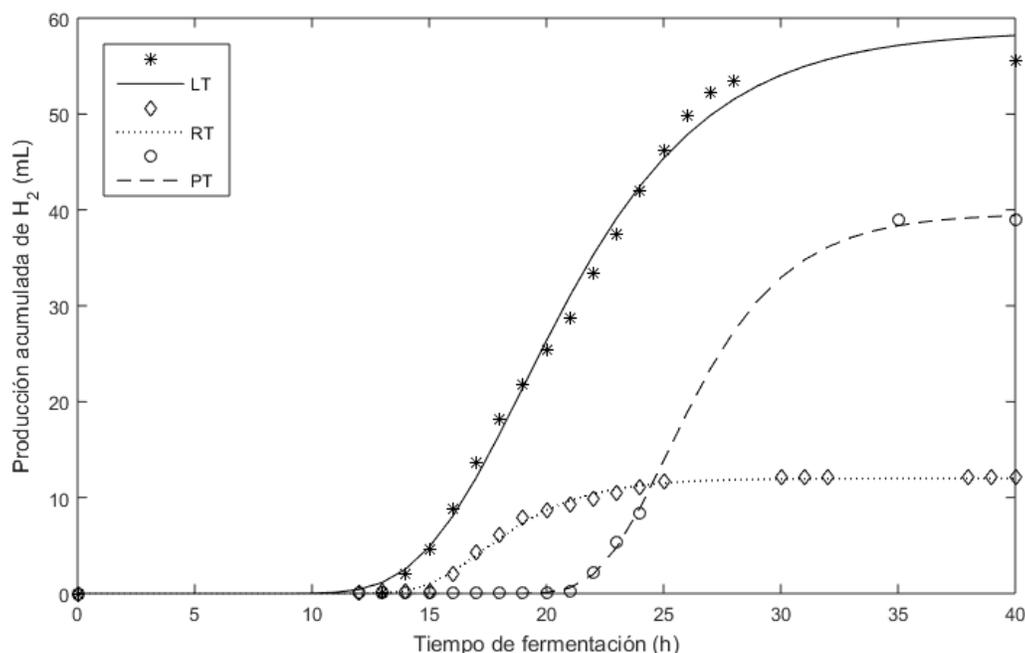
Nota: Literales en cada media señalan diferencias estadísticas según la prueba de Duncan con  $\alpha = 0.05$ , en el que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias.



**Figura 9.** Volumen acumulado de hidrógeno de acuerdo con el pretratamiento y tipo de inóculo.

Con base a la Figura 9 y Tabla 8, la mayor producción de hidrógeno se logró con el lodo anaerobio municipal y lodo anaerobio porcino, ambos estadísticamente similares; mientras que al usar el líquido ruminal se presentó una producción irregular de hidrógeno, teniendo valores cercanos a cero en una réplica, lo cual ocasiona un alto valor en su coeficiente de variación (87 %).

En la **Figura 10** se presentan los valores estimado del modelo de Gompertz del volumen máximo de producción de hidrógeno, la tasa máxima de rendimiento y tiempo de fase de latencia estimado de 58.69 mL, 4.91 mL/h y 14.63 h para el lodo anaerobio municipal; 39.62 mL, 5.07 mL/h y 22.27 h para el lodo anaerobio porcino; y 11.99 mL, 1.81 mL/h y 14.82 h para el líquido ruminal.



**Figura 10.** Producción acumulada de H<sub>2</sub> de acuerdo con el modelo de Gompertz.

El tiempo de latencia de 14-22 h fue el tiempo necesario de adaptación de los microorganismos productores de hidrógeno para consumir la sacarosa y generar hidrógeno, teniendo el menor tiempo de latencia el lodo anaerobio municipal y el líquido ruminal.

Se han reportado diversos comportamientos cinéticos en la producción de hidrógeno, los cuáles presentan valores diferentes al presente trabajo. Las diferencias pueden

estar influenciadas por el tipo de inóculo, el modo de operación de la planta de tratamiento fuente del inóculo, temperatura y tiempo de exposición del choque térmico, la concentración del sustrato y del medio nutritivo, el pH inicial-final, tamaño y tiempo de operación del reactor; así como de la relación inóculo-sustrato. A continuación, se mencionan algunos estudios y la descripción de sus comportamientos cinéticos.

Cai et al. (2009) reportaron un volumen máximo de 1240 de mL H<sub>2</sub>/L, rendimiento de 28.7 mL H<sub>2</sub>/h, tiempo de latencia de 26 h, utilizando lodo marino como fuente de inóculo. Este recibió un pretratamiento térmico de 100 °C por 90 min en un reactor de 250 mL, con un pH inicial de 8, finalizando a pH 5.3 en un tiempo de fermentación de 100 h, incubado a 35 °C con agitación de 150 rpm.

Dong et al. (2009) inocularon un lodo anaerobio municipal pretratado con choque térmico por 15 min (no se menciona temperatura) en botellas serológicas de 500 mL a 37 °C con agitación de dos veces al día en siete diferentes sustratos vegetales de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos, en el que los mejores resultados se obtuvo con arroz, tomate y lechuga como sustrato. Cada sustrato presentó diferentes comportamientos cinéticos en la producción de hidrógeno, teniendo una producción máxima de H<sub>2</sub>, un rendimiento de H<sub>2</sub> y tiempo de latencia de 1056 mL, 896 mL/d, 0.6 d para el arroz; 816 mL, 744 mL/d, 0.2 d en el caso del tomate; y finalmente la lechuga, presentó coeficientes de 384 mL, 392 mL/d, 0.1 d. Estas diferencias fueron asociadas a los contenidos de carbohidratos celulósicos y amiláceos de los sustratos.

Kawagoshi et al. (2005) al usar seis tipos de inóculos, menciona que la producción de hidrógeno inició después de 10 h de la inoculación con lodo anaerobio municipal, sedimento de lago y suelo agrícola, a comparación del uso de composta, la cual inició a las 20 h de inoculación. Cada inóculo recibió un pretratamiento térmico de 100 °C por 2 h, siendo aclimatadas en frascos de 100 mL con 35 °C de incubación, durante 45 h de operación.

Lin et al. (2011) emplearon lodo anaerobio de una PTAR procesadora de fructuosa, aplicando un choque térmico de 100 °C por 2 h, alimentando los microorganismo con fructuosa y melaza a pH inicial de 4-8, incubando en un rango de 35-55 °C con agitación de 90 rpm en reactores 2500 mL durante 120 h de operación. La mejor

producción de hidrógeno la obtuvo a una incubación de 55 °C, en donde los coeficientes cinéticos de volumen acumulado, rendimiento y tiempo de latencia fueron de 236 mL H<sub>2</sub>, 4.7 mL H<sub>2</sub>/h y 12 h a un pH 6 empleando melaza como sustrato; mientras que al alimentar con fructuosa los coeficientes fueron de 210 mL H<sub>2</sub>, 10.4 mL H<sub>2</sub>/h y 12 h.

Mu et al. (2011) al utilizar tres pretratamientos para favorecer la presencia de microorganismos productores de hidrógeno, obtuvo los mejores resultados con la aplicación del choque térmico (102 °C por 90 min), el cual propició un tiempo de latencia más corto (17 h) a comparación de los pretratamientos ácidos y básicos que resultaron un tiempo de latencia mayor de 19 h y 27 h.

En la Tabla 9 se comparan los resultados obtenidos en el presente estudio y otros reportados en la literatura. Los mencionados estudios obtuvieron mayores rendimientos y porcentaje de hidrógeno al utilizar el choque térmico como pretratamiento en comparación con el presente trabajo de investigación. Estas diferencias se pueden sustentar en el efecto del pretratamiento sobre la diversidad microbiana inicial, debido a que el choque térmico tiene la limitante de reducir la diversidad microbiana al aplicar altas temperaturas con largos tiempos de exposición (Wang et al. 2011), ya que muchos productores de hidrógeno no formadoras de espora son destruidas, resultando en un bajo rendimiento en la producción de hidrógeno (Ren et al. 2008).

Autores como Cai y Wang (2016), Kawagoshi et al. (2005), Lin et al. (2011) mencionan que existe una significativa diferencia en la composición microbiana después de la aplicación de un pretratamiento. Microorganismos productores de hidrógeno como *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Enterobacter* spp., *Lactobacillus* spp. y *Coprothermobacter* spp. han sido observados al aplicar algún pretratamiento; mientras que aquellos cultivos que no recibieron algún pretratamiento presentaron microorganismos no productores de hidrógeno como *Lactobacillus fermentum* y *Enterobacteriales bacterium*, así como una comunidad microbiana más amplia.

Un máximo de 4 moles de H<sub>2</sub> por mol de hexosa como sustrato pueden ser producidos durante la fermentación oscura, a pesar de tener un rendimiento por estequiometría de

12 moles al oxidar la hexosa en H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (Reith et al. 2003). Este rendimiento es afectado por la presión parcial de los productos de la fermentación oscura al formar ácidos grasos diferentes al ácido acético o alcoholes. Diversos estudios señalan que el uso de cultivos puros como *Bacillus*, *Clostridium*, y *Enterobacter* puede alcanzar rendimientos mayores de 2 moles por mol de sustrato mediante la vía metabólica acética/butírica (Reith et al. 2003; Cai et al. 2009).

Con respecto al uso de líquido ruminal como inóculo, el rendimiento en los productos finales de la fermentación en rumiantes depende de la cantidad y calidad del alimento, prácticas agropecuarias, clima y vegetación local, así como el tipo y actividad de la comunidad microbiana (Huo et al. 2013; Henderson et al. 2015; AlZahal et al. 2017). Cuando se ha utilizado líquido ruminal como fuente de inóculo, se reporta que la predominancia de *Ruminococcus* sp contribuye a la formación de H<sub>2</sub> con rendimiento alrededor de 2 moles por mol de sustrato (Reith et al. 2003).

Una posible razón del inestable comportamiento del líquido ruminal se deba a la disponibilidad de MPH, ya que el 70 % de la población bacteriana está asociada a las partículas del sustrato (Nagaraja 2016), el cual fue desechado y no se utilizó como parte del inóculo; el restante 30 % de población bacteriana se encuentra en el fluido ruminal, siendo utilizado como inóculo. Esta menor cantidad de población bacteriana del fluido ruminal pudo ocasionar la inestable producción de hidrógeno, al limitar la cantidad de MPH, ya que posiblemente estas bacterias sobrevivientes sean del tipo homoacetogénicas, las cuales forman acetato a partir del consumo de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (Saady 2013).

**Tabla 9.** Rendimientos de hidrógeno reportado en la literatura mediante choque térmico.

Fuente del inóculo	Condición	Sustrato	mol H <sub>2</sub> /mol-sustrato	mL H <sub>2</sub> /g-sustrato	%H <sub>2</sub>	Autores
Lodo anaerobio municipal	Por lotes	Sacarosa	0.53	36.95	25	Presente estudio
Lodo anaerobio porcino	Por lotes	Sacarosa	0.37	25.86	18	Presente estudio
Líquido ruminal	Por lotes	Sacarosa	0.11	8.04	9	Presente estudio
Lodo anaerobio municipal	Por lotes	Glucosa	1.1-2.02	-	-	(Abdallah et al. 2016)
Estiércol de vaca	Por lotes	Residuos vegetales	-	3.44	-	(Bansal et al. 2013)
Sedimento marino	Por lotes	Sacarosa	-	79	-	(Cai et al. 2009)
Sedimento marino	Por lotes	Sacarosa	1.15	75.5	-	(Cai y Wang 2016)
Estiércol de vaca	Por lotes	Sacarosa	-	89.8-146.5	-	(Fan et al. 2004)
Lodo anaerobio municipal	Por lotes, Continuo	Glucosa	-	118.3-134.1	-	(Hu y Chen 2007)
Suelo agrícola	Continuo	Glucosa	1.61-1.8	-	56-57	(Iyer et al. 2004)
Lodo anaerobio municipal	Por lotes	Glucosa	1.4	-	-	(Kawagoshi et al. 2005)
Lodo porcino	Por lotes	Residuos de cocina	-	50-134	37-70	(Dong et al. 2009)
Lodo activado municipal	Por lotes	Sacarosa	4.8	-	52-55	(Lin y Lay 2004)
Lodo anaerobio UASB	Por lotes	Sacarosa	2	-	-	(Mu et al. 2007)
Lodo anaerobio municipal	Por lotes	Glucosa	1.78	221.5	44.5	(Wang y Wan 2008)
Lodo anaerobio municipal	Continuo	Sacarosa	0.86-3.48	-	36-44	(Wu et al. 2005)

### **6.3. Subproductos de la fermentación oscura**

#### **6.3.1. pH, COT y DQO de la fracción líquida**

Durante el proceso de producción de hidrógeno, los valores de pH para todos los tratamientos disminuyeron de un pH inicial de 5.5 a un rango de 3-5, en el que la variación del pH no es afectada por el pretratamiento ni por el tipo de inóculo (

Tabla 10).

La reducción del pH es explicada por la presencia de microflora acidogénica, quienes agotan la capacidad buffer del medio por la formación de ácidos orgánicos, resultando en el decaimiento del pH inicial (Kapdan y Kargi 2006; Cai et al. 2009; Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo 2009; Lin et al. 2011; Wongthanate et al. 2014). Se ha reportado que la gradual disminución del pH inhibe la producción de hidrógeno al afectar la actividad de la enzima hidrogenasa, responsable de la formación de hidrógeno molecular; así mismo, el cambio de pH modifica la vía fermentativa de formación de ácidos orgánicos (Kapdan y Kargi 2006; Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo 2009).

En la Figura 11 el choque térmico no influyó en el porcentaje de remoción ( $16.1 \% \pm 7.6$  DQO<sub>s</sub> eliminado), teniendo valores similares al tratamiento control ( $12.7 \% \pm 7$  DQO<sub>s</sub> eliminado); mientras que el inóculo porcino produjo un aumento de la remoción de DQO ( $21.48 \% \pm 4.4$ ) a comparación del inóculo municipal ( $12.03 \% \pm 7.1$  DQO<sub>s</sub> eliminado) y el líquido ruminal ( $9.36 \% \pm 2.9$  DQO<sub>s</sub> eliminado). A diferencia de otros estudios, se obtuvo una menor remoción de DQO.

Bansal et al. (2013) obtuvieron una remoción de 36-81 % de la DQO durante 25 días de operación, a un valor inicial al presente trabajo (20 g/L DQO), encontrando que aquellos inóculos con mayor remoción de DQO obtuvieron los mayores porcentajes de hidrógeno en el biogás. Lo anterior también se relaciona con las temperaturas del choque térmico, ya que los mejores resultados se obtuvieron con temperaturas.

Mohammadi et al. (2012) al utilizar cinco pretratamientos consiguió la mejor remoción de la DQO con un 62 % por 72 h de operación al aplicar el choque térmico de 100 °C por 1 h a un inóculo proveniente de un lodo granular UASB. Esta remoción, favoreció el mejor rendimiento de hidrógeno con 14.62 mL H<sub>2</sub>/g DQO.

Es importante señalar que no se produce una reducción importante de la DQO, ya que lo que ocurre es la conversión de las moléculas orgánicas complejas en ácidos orgánicos de cadena corta, así como la formación de alcoholes, compuestos intermedios, biomasa, y el propio sustrato no consumido, que en conjunto ejercen una demanda de oxígeno (Ramalho 2003; de Amorim et al. 2012). Por lo que si se llevara a una escala industrial la producción de bio-hidrógeno, será necesario diseñar un

proceso de estabilización de los productos de la fermentación para cumplir con las disposiciones ambientales de descarga de aguas residuales tratadas.

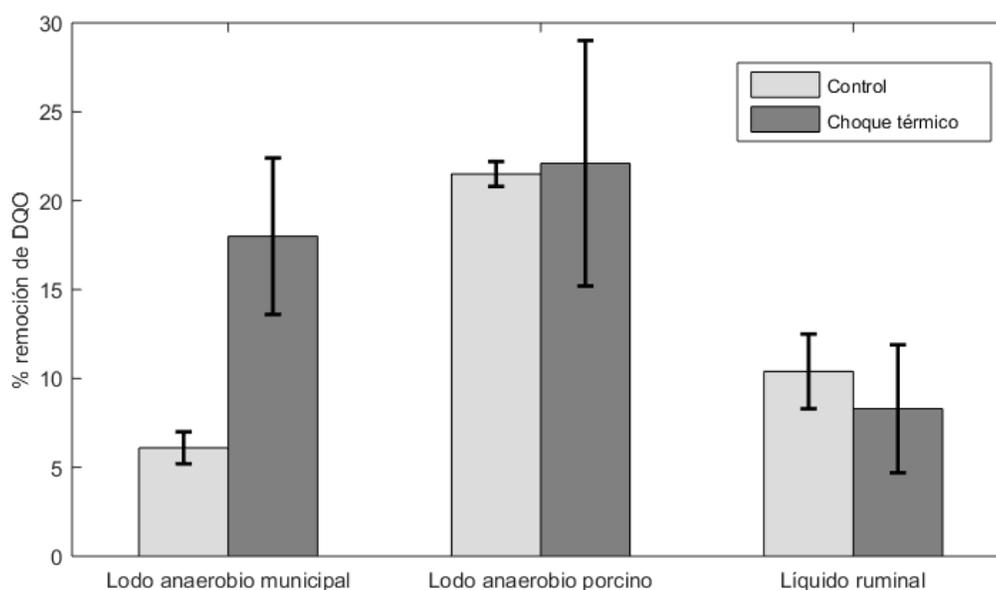
Por otra parte, en la Figura 12 se obtuvo un ligero incremento de remoción del  $COT_s$  ( $68.9 \% \pm 4.1$ ) al utilizar el choque térmico, a diferencia del tratamiento control ( $62.1 \% \pm 5.8$   $COT_s$  eliminado). La remoción del  $COT_s$  también se vio afectada por el tipo de inóculo al tener una mejor remoción por parte del lodo anaerobio porcino ( $69.2 \% \pm 3.8$   $COT_s$  eliminado) y municipal ( $67.6 \% \pm 4.5$   $COT_s$  eliminado), ambos estadísticamente similares; mientras que el líquido ruminal obtuvo la menor remoción con un  $59.8 \% \pm 5.4$ .

Gioaniss et al. (2014) mencionan que no se logra una remoción al 100 % de la  $COT_s$  debido al remanente de sustrato no degradado y por los metabolitos de la fermentación (AGV's y alcoholes). Este mismo estudio establece que la remoción de  $COT_s$  como función del pH, por la formación de AGV's, no se correlaciona con la producción de  $H_2$ ; por lo cual, a pesar de existir altas remociones de  $COT_s$ , esta no se relaciona con las condiciones de pH óptimo para el proceso hidrogenogénico. Lo anterior indica que es más relevante el tipo de vía fermentativa de la materia orgánica para la optimización de la producción de hidrógeno, que el consumo del sustrato.

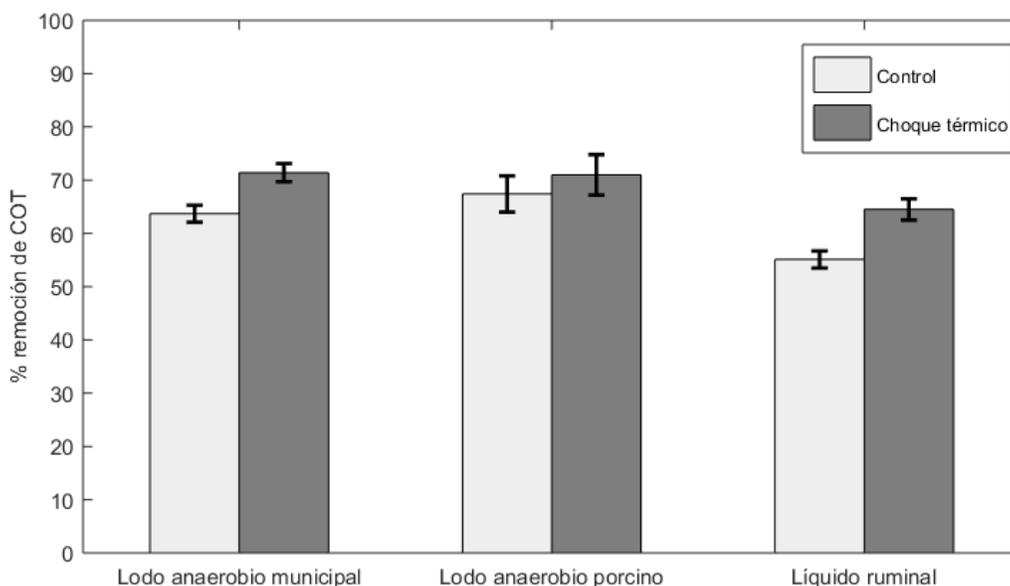
**Tabla 10.** Valores de pH final, DQO<sub>s</sub> y COT<sub>s</sub> por pretratamiento e inóculo.

Pretratamiento	Inóculo	pH final	Remoción de DQO <sub>s</sub> (%)	Remoción de COT <sub>s</sub> (%)
Control	LC	3.95 ± 0.04 a	6.1 ± 0.9 a	63.7 ± 1.6 a
	PC	5.05 ± 0.26 b	21.5 ± 0.7 b	67.4 ± 3.4 b
	RC	3.18 ± 0.03 c	10.4 ± 2.1 a	55.1 ± 1.6 c
Choque térmico	LT	4.38 ± 0.07 d	18.0 ± 4.4 b	71.4 ± 1.7 d
	PT	4.23 ± 0.20 d	22.1 ± 6.9 b	71.0 ± 3.8 d
	RT	4.26 ± 0.09 d	8.3 ± 3.6 a	64.5 ± 2.0 ab

Nota: Literales en cada media señalan diferencias estadísticas según la prueba de Duncan con  $\alpha=0.05$ , en el que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias.



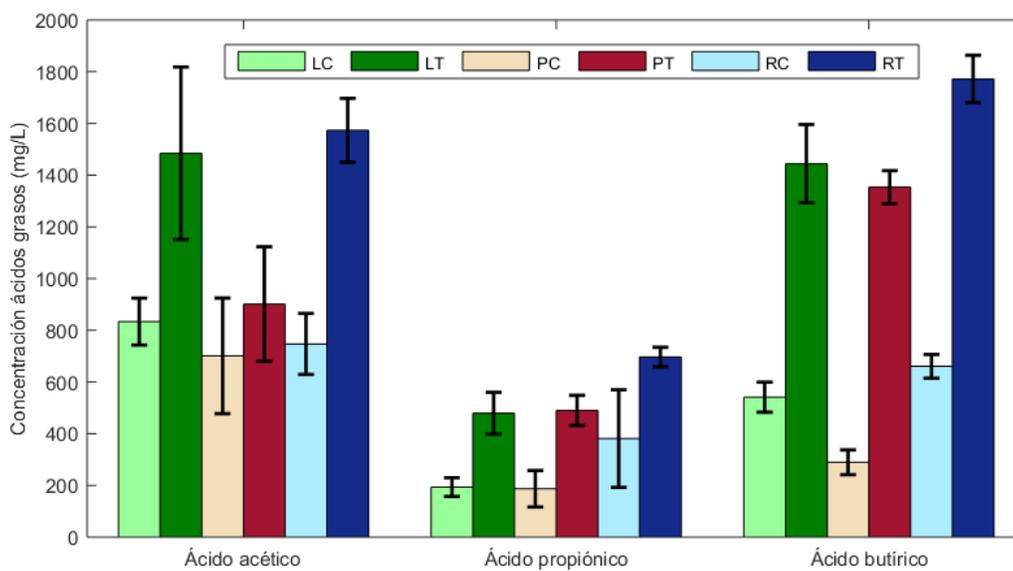
**Figura 11.** Porcentaje de remoción de DQO por tipo de pretratamiento y de inóculo.



**Figura 12.** Porcentaje de remoción de COT<sub>s</sub> por tipo de pretratamiento y de inóculo.

### 6.3.2. Ácidos grasos volátiles

La **Error! Reference source not found.** muestra la concentración de HAc, HPr y HBu en los diferentes tratamientos. La producción de AGV indica una fermentación mixta acetato/butírico, con resultados similares a otros estudios (Lin y Lay 2004; Mu et al. 2007; Ren et al. 2008; Wang et al. 2011; Reyhani y Zilouei 2013; Abdallah et al. 2016) en el que el ácido acético y ácido butírico fueron los mayores productos de la fermentación oscura. Posiblemente el pH haya influido en el tipo de vía fermentativa, debido a que la formación de ácido acético y ácido butírico es favorecida a pH 4-6 por sobre la formación de ácido propiónico, ácido láctico, y solventes como etanol, propanol y butanol (Hwang et al. 2004; Hawkes et al. 2007; Pakarinen et al. 2008; Guo et al. 2010).



**Figura 13.** Concentración de HAc, HPr y HBu en los diferentes tratamientos.

Dong et al. (2009) mencionan que una alta concentración de AGV's puede ocasionar la inhibición de la producción de hidrógeno gracias a que la forma no disociada de los ácidos grasos volátiles es capaz de atravesar la membrana bacteriana, provocando que la célula disminuya su actividad al bombear iones fuera de ella para prevenir condiciones fisiológicas desfavorables. Pero si la concentración de AGV's es tan alta, puede provocar la lisis de la célula al existir un exceso de iones en el medio acuoso. Lo anteriormente mencionado explica el decaimiento del pH.

Los estudios que a continuación se mencionarán, obtuvieron vías fermentativas diferentes al presente estudio, en el que la comunidad microbiana del inóculo, el tipo de pretratamiento, pH inicial, temperatura de incubación y las características del sustrato influyen en la vía fermentativa que los microorganismos seguirán.

Cai y Wang (2016) indican que el pretratamiento térmico favoreció una fermentación de etanol y ácido acético, contabilizando un 80.44 % de concentración de estos metabolitos al utilizar lodo marino pretratado a 100 °C por 30 min a pH inicial de 7, con incubación de 35 °C, utilizando sacarosa como sustrato.

Bansal et al. (2013) reportaron que el mayor ácido graso fue el butírico al usar estiércol de vaca como fuente de inóculo en restos de cocina como sustrato, encontrando que a mejor relación ácido butírico/propiónico se obtienen altos porcentajes de hidrógeno en el biogás.

Hwang et al. (2004) describen en su estudio que las vías fermentativas se ven afectadas por el pH del medio, teniendo como principales productos de fermentación el ácido acético y etanol en alrededor de un 80 % del total de AGV después de 60 días de operación con un contenido de hidrógeno del 25-40 %. Este estudio sugiere que la variación en el porcentaje de hidrógeno se debió a la predominancia del ácido propiónico en los primeros diez días de operación, momento en el que el pH fue ajustado a un valor de 5, teniendo como consecuencia el incremento de las concentraciones de ácido butírico y etanol, lo cual aumentó la producción de hidrógeno.

Kawagoshi et al. (2005) utilizaron seis tipos de inóculos, alimentados con glucosa, aplicando dos pretratamientos (térmico y ácido), reportando que el uso de lodo anaerobio municipal favoreció una vía mixta ácido acético/butírico, mientras que otros inóculos como lodo activado, suelo agrícola y composta favorecieron una fermentación láctica. Estas diferencias de las vías fermentativas fueron atribuidas a la comunidad bacteriana intrínseca de cada inóculo y al pH del medio que condiciona el tipo de bacteria a desarrollarse.

Wang y Wan (2008) al estudiar el efecto de cinco pretratamientos en la producción de H<sub>2</sub> sobre un inóculo proveniente de un digestor anaerobio primario de una PTAR, logró el mejor rendimiento de hidrógeno con el pretratamiento térmico (100° por 15 min) a un pH inicial de 7. Este pretratamiento favoreció una vía fermentativa de etanol y ácido acético, con una predominancia del 95 % de etanol en los productos de la fermentación. La baja concentración de ácido acético fue atribuida a la capacidad del pretratamiento térmico en la inactivación de las bacterias homoacetogénicas, las cuales son responsables de formar acetato a partir del H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.

Xiao y Liu (2009) obtuvieron una vía fermentativa de tipo acética (66 % del contenido de AGV) al inocular con lodo activado municipal pretratado a 121 °C durante 30 min.

Este mismo estudio aplicó otros pretratamientos, como acidificación, alcalinización, y ultrasonificación, en donde la fermentación fue mayormente de tipo acética (> 45 % al contenido de AGV).

Se reporta que cuando el ácido propiónico predomina como vía fermentativa (Chen et al. 2001; Hwang et al. 2004; Kawagoshi et al. 2005; Bansal et al. 2013), se disminuye sustancialmente la producción de hidrógeno.

En los anteriores estudios, los grupos controles generaron menor cantidad de ácidos grasos, lo cual sugiere que el pretratamiento térmico favorece la presencia de bacterias acetogénicas, como *Clostridium* spp., permitiendo la formación de acetato, butirato, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> (Schuchmann y Müller 2016).

Entre los géneros de bacterias ruminales capaces de producir ácido acético, butírico y propiónico se encuentran *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Ruminobacter*, *Prevotella*, *Succinimonas*, *Anaerovibrio*, *Eubacterium*, *Megasphaera*, *Treponema*, *Peptostreptococcus* y *Lachnospira* (Ransom-Jones et al. 2012; Huo et al. 2013; Henderson et al. 2015; Nagaraja 2016; AlZahal et al. 2017; Wu et al. 2017). De los anteriores géneros, se ha reportado que algunas especies formadoras de esporas de *Clostridium* spp., *Streptococcus* spp., *Ruminococcus* spp. y *Peptostreptococcus* spp. son capaces de producir ácido acético a través del consumo de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (Rieu-Lesme et al. 1996a; Rieu-Lesme et al. 1996b). Lo anterior explica que la concentración de ácidos grasos del tratamiento RT presente semejantes contenido de AGV's con respecto al tratamiento LT y PT, así como baja producción de hidrógeno, ya que las bacterias formadoras de espora que sobrevivieron fueron homoacetogénicas (consumidoras de H<sub>2</sub>).

Chen et al. (2001), Hawkes et al. (2007), y Lin et al. (2011) sugieren que la capacidad de producir hidrógeno se relaciona con la relación ácido butírico/acético (HBu/HAc). Chen et al (2001) obtuvo una tasa HBu/HAc de 5.1; Lin et al. (2011) reporta una tasa de 1.3-3.1 para fructuosa como sustrato y una tasa de 1.4-2.3 para melaza como fuente de energía. Los anteriores estudios tienen valores superiores al obtenido en el presente experimento (**Tabla 11**). Este mismo autor explica la tasa HBu/HAc es dependiente del tipo de inóculo y de sustrato.

**Tabla 11.** Composición de ácidos grasos volátiles en el contenido de los reactores.

Pretratamiento	Inóculo	HAc (mg/L)	HPr (mg/L)	HBu (mg/L)	Tasa HBu/HAc
Control	LC	834 ± 91 a	194 ± 36 a	541 ± 58 a	0.65
	PC	701 ± 224 a	187 ± 70 a	290 ± 48 b	0.44
	RC	747 ± 118 a	381 ± 188 b	660 ± 46 a	0.88
Choque térmico	LT	1485 ± 334 b	479 ± 81 b	1444 ± 152 c	0.97
	PT	902 ± 221 a	490 ± 58 b	1354 ± 64 c	0.42
	RT	1573 ± 124 b	696 ± 38 c	1772 ± 92 d	1.13

Nota<sup>1</sup>: HAc: ácido acético, HPr: ácido propiónico, HBu: ácido butírico.

Nota<sup>2</sup>: Literales en cada media señalan diferencias estadísticas según la prueba de Duncan con  $\alpha=0.05$ , en el que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias.

En contraparte, De Amorim et al. (2012) y Xiao & Liu (2009) reportan que las mejores producciones de hidrógeno se logran a mayores tasas de HAc/HBu debido a que estequiométricamente la fermentación de un azúcar hacia ácido acético produce más moles de hidrógeno. Esta inconsistencia puede ser atribuida a los tipos de vías fermentativas usadas por los microorganismos y que se relacionan con la comunidad microbiana del inóculo posterior al choque térmico.

Conjuntando toda la información sobre el trabajo se afirma que la aplicación del choque térmico, como estrategia de enriquecer el inóculo con microorganismos productores de hidrógeno (MPH), permitió la selección de aquellas especies que puedan formar esporas, y posteriormente, adaptarse al nuevo medio para la degradación del sustrato con la consecuente producción de hidrógeno. Así mismo, es importante señalar que la calidad del pretratamiento y la fuente del inóculo afectarán de manera crítica la producción de hidrógeno en su comportamiento cinético y en el tipo de vía fermentativa que seguirán los microorganismos debido a que el inóculo contiene una “comunidad microbiana preferencial”. Esto último hace referencia a que la comunidad microbiana se relaciona estrechamente con los sustratos mayoritarios del agua residual en el que se encuentra el inóculo.

Finalmente, será necesario estudiar la producción de hidrógeno utilizando residuos agropecuarios, industriales y municipales con la finalidad de generar un valor agregado al tratamiento de residuos.

## 7. Conclusiones

Los resultados indican que el pretratamiento térmico incrementó 4-10 veces el volumen de biogás en comparación al tratamiento control, obteniendo los mejores resultados con el lodo anaerobio municipal ( $213 \pm 56$  mL) y lodo anaerobio porcino ( $216 \pm 37$  mL).

Lo anterior se explica por el efecto por el choque térmico sobre el inóculo al favorecer una fermentación mixta acético/butírico, reflejándose en el doble de concentración de HAc (1320 mg/L), HPr (555 mg/L) y HBU (1523 mg/L). Estas concentraciones de AGV provocaron la acidificación del contenido del reactor, al pasar de un pH 5.5 a 4.2. Así mismo, debido al remanente de sustrato no degradado y a los metabolitos de la fermentación, se permitió eliminar del  $16.1 \pm 7.6$  % de la DQO<sub>s</sub> y  $68.9 \pm 4.1$  % de la COT<sub>s</sub>.

El choque térmico inhibió la fase metanogénica al generarse menos de 0.5 % de CH<sub>4</sub> en el biogás, permitiendo la acumulación de H<sub>2</sub> con un 9-28 % en la composición del biogás, debido a la inhibición de los MCH. Se presentaron los mejores rendimientos con el lodo anaerobio municipal ( $0.53 \text{ mol H}_2/\text{mol}_{\text{sustrato}}$ ) y lodo anaerobio porcino ( $0.37 \text{ mol H}_2/\text{mol}_{\text{sustrato}}$ ). Estos inóculos manifestaron coeficientes cinéticos del modelo de Gompertz de 58.69 mL H<sub>2</sub>, 4.91 mL H<sub>2</sub>/h y 14.63 h de latencia para el lodo anaerobio municipal; 39.62 mL H<sub>2</sub>, 5.07 mL H<sub>2</sub>/h y 22.27 h de latencia para el lodo anaerobio porcino.

Finalmente, el líquido ruminal presentó volúmenes de H<sub>2</sub> semejante al tratamiento control, pero con concentraciones de AGV similares al choque térmico. Esto se puede explicar por la presencia de bacterias homoacetogénicas y la baja cantidad de MPH al desechar el material particulado del contenido ruminal, ya que gran parte de la población bacteriana está asociada a las partículas del sustrato.

## 8. Recomendaciones

- Emplear un consorcio microbiano con mayor densidad de MPH o aumentar la comunidad de MPH en condiciones de laboratorio para su inoculación en los reactores.
- Comparar la producción de H<sub>2</sub> con residuos locales ricos en carbohidratos, así como evaluar el rendimiento a diferentes relaciones de sustrato/inóculo.
- Dado que el proceso de fermentación oscura no logró eliminar más del 25% de la DQO<sub>s</sub>, sería útil emplear un sistema de digestión anaerobia de doble etapa, con la finalidad de generar hidrógeno en la primera etapa, y utilizar el digestato en una segunda etapa para la producción de metano y estabilizar la DQO<sub>s</sub> a valores permisibles por la NOM-001-SEMARNAT-1996.
- Evaluar la fermentación oscura en condiciones de flujo discontinuo y continuo con el fin de analizar el proceso en escenarios semejantes a la realidad de una PTAR.

## 9. Referencias bibliográficas

- Abdallah, R., Djelal, H., Amrane, A., Sayed, W., Fourcade, F., Labasque, T., Geneste, F., Taha, S., Floner, D. (2016). Dark fermentative hydrogen production by anaerobic sludge growing on glucose and ammonium resulting from nitrate electroreduction. International Journal of Hydrogen Energy, 41(12), 5445-5455. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.02.030>
- Adekunle, K., & Okolie, J. (2015). A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion. Advances in Bioscience and Biotechnology, 6, 205-212. doi:10.4236/abb.2015.63020
- Adorno, M., Hirasawa, J., & Varesche, 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. doi:10.4236/ajac.2014.57049
- Aguilar, Q., Armijo, C., & Taboada, P. (2009). El potencial energético de los residuos sólidos municipales. Ingeniería, Revista Académica de la FI-UADY, 13, 59-62.
- AlZahal, O., Li, F., Guan, L. L., Walker, N. D., & McBride, B. W. (2017). Factors influencing ruminal bacterial community diversity and composition and microbial fibrolytic enzyme abundance in lactating dairy cows with a focus on the role of active dry yeast. Journal of Dairy Science, 100(6), 4377-4393. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11473>
- Appels, L., Baeyens, J., Degève, J., & Dewil, R. (2008). Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. Progress in Energy and Combustion Science, 34(6), 755-781. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.06.002>
- Argun, H., & Kargi, F. (2011). Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. International Journal of Hydrogen Energy, 36(13), 7443-7459. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.116>

- Association, A. P. H., Association, A. W. W., & Federation, W. E. (2012). Standard Methods for examination of water and wastewater (E. W. Rice, R. B. Baird, A. D. Eaton, & L. S. Clesceli Eds. 22nd ed.). Washington, D.C.: APHA, AWWA, WEF.
- Avaci, A. B., Souza, S. N. M. d., Chaves, L. I., Nogueira, C. E. C., Niedzialkoski, R. K., & Secco, D. (2013). Avaliação econômico-financeira da microgeração de energia elétrica proveniente de biogás da suinocultura. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 17, 456-462.
- Bansal, S. K., Sreekrishnan, T. R., & Singh, R. (2013). Effect of Heat Pretreated Consortia on Fermentative Biohydrogen Production from Vegetable Waste. *National Academy Science Letters*, 36(2), 125-131. doi:10.1007/s40009-013-0124-4
- Bedoya, A., Castrillón, J., Ramírez, J., Vásquez, J., & Arias, M. (2008). Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte. *Revista DYNA Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia*, 75(154), 137-157.
- Blanco, D., Suárez, J., Jiménez, J., González, F., Álvarez, L. M., Cabeza, E., & Verde, J. (2015). Eficiencia del tratamiento de residuales porcinos en digestores de laguna tapada. *Pastos y Forrajes*, 38(4), 441-447.
- Blanco, S. A., & Rodríguez, T. (2012). Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura: una revisión crítica (1993-2011). *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 20, 398-411.
- 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. *Bioresource Technology*, 101(23), 9071-9077. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.127
- Bundhoo, M. A. Z., & Mohee, R. (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(16), 6713-6733. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057

- Cai, J., & Wang, G. (2016). Comparison of different pre-treatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from intertidal sludge. *International Journal of Green Energy*, 13(3), 292-297. doi:10.1080/15435075.2014.893436
- Cai, J., Wang, G., Li, Y., Zhu, D., & Pan, G. (2009). Enrichment and hydrogen production by marine anaerobic hydrogen-producing microflora. *Chinese Science Bulletin*, 54(15), 2656-2661. doi:10.1007/s11434-009-0399-5
- Chen, C. C., Lin, C. Y., & Chang, J. S. (2001). Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1), 56-64. doi:10.1007/s002530100747
- Choi, J.-A., Hwang, J.-H., Dempsey, B. A., Abou-Shanab, R. A. I., Min, B., Song, H., . . . Jeon, B.-H. (2011). Enhancement of fermentative bioenergy (ethanol/hydrogen) production using ultrasonication of *Scenedesmus obliquus* YSW15 cultivated in swine wastewater effluent. *Energy & Environmental Science*, 4(9), 3513-3520. doi:10.1039/C1EE01068A
- Chong, M.-L., Sabaratnam, V., Shirai, Y., & Hassan, M. A. (2009). Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(8), 3277-3287. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.010
- CMNUCC. (1992). Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. Estados Unidos: [https://unfccc.int/files/essential\\_background/background\\_publications\\_htmlpdf/application/pdf/convsp.pdf](https://unfccc.int/files/essential_background/background_publications_htmlpdf/application/pdf/convsp.pdf)
- CMNUCC. (1999). Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático de 1994. Ginebra, Suiza.
- Corrales, L. C., Antolinez Romero, D. M., Bohórquez Macías, J. A., & Corredor Vargas, A. M. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 13, 55-81.
- De Amorim, E. L. C., Sader, L. T., & Silva, E. L. (2012). Effect of substrate concentration on dark fermentation hydrogen production using an anaerobic fluidized bed reactor.

Applied Biochemistry and Biotechnology, 166(5), 1248-1263. doi:10.1007/s12010-011-9511-9

De Gioannis, G., Friargiu, M., Massi, E., Muntoni, A., Polettini, A., Pomi, R., & Spiga, D. (2014). Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. International Journal of Hydrogen Energy, 39(36), 20930-20941. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.046>

Dhar, B. R., Elbeshbishy, E., Hafez, H., & Lee, H.-S. (2015). Hydrogen production from sugar beet juice using an integrated biohydrogen process of dark fermentation and microbial electrolysis cell. Bioresource Technology, 198(Supplement C), 223-230. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.048>

Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S., Xiaoying, K., & Yu, Z. (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. International Journal of Hydrogen Energy, 34(2), 812-820. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.031>

Ducey, T. F., & Hunt, P. G. (2013). Microbial community analysis of swine wastewater anaerobic lagoons by next-generation DNA sequencing. Anaerobe, 21, 50-57. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.03.005>

Fan, Y., Li, C., Lay, J.-J., Hou, H., & Zhang, G. (2004). Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost. Bioresource Technology, 91(2), 189-193. doi:[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00175-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00175-5)

Ferrer, Y., & Pérez, H. (2010). Los microorganismos en la digestión anaerobia y la producción de biogás: Consideraciones en la elección del inóculo para el mejoramiento de la calidad y el rendimiento. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 43(1), 9-20.

Giovannini, G., Riffaldi, R., & Levi-Minzi, R. (1985). Determination of organic matter in sewage sludges. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 7(16), 775-785. <https://doi.org/10.1080/00103628509367643>

- Gonzalez, D., & Márquez, E. (2008). Cambio climático global. México: Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, ADN Editores.
- Grady, C. P. L., Daigger, G. T., Love, N. G., & Filipe, C. D. M. (2011). Biological Wastewater Treatment, Third Edition: CRC Press.
- Gray, N. (2010). Anaerobic treatment. En N. Gray (Ed.), *Water technology: An introduction for environmental scientists and engineers* (Third ed., pp. 585-604 ). China: ELSEVIER, IWA Publishing, Butterworth-Heinemann.
- Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., & Steyer, J.-P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10660-10673. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>
- Han, S.-J., Yoo, M., Kim, D.-W., & Wee, J.-H. (2011). Carbon dioxide capture using calcium hydroxide aqueous solution as the absorbent. *Energy & Fuels*, 25(8), 3825-3834. doi:10.1021/ef200415p
- Hawkes, F. R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., & Hawkes, D. L. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(2), 172-184. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.08.014>
- Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., Global Rumen Census, C., & Janssen, P. H. (2015). Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports*, 5, 14567.
- Hu, B., & Chen, S. (2007). Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(15), 3266-3273. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.03.005>
- Huo, W., Zhu, W.-Y., & Mao, S. (2013). Impact of subacute ruminal acidosis on the diversity of liquid and solid-associated bacteria in the rumen of goats. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(2), 669-680. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1489-8>

- Hwang, M. H., Jang, N. J., Hyun, S. H., & Kim, I. S. (2004). Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. *Journal of Biotechnology*, 111(3), 297-309. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.04.024>
- IEA. (2016). World energy balances. Francia: International Energy Agency.
- IPCC. (2014). Cambio climático 2014: Impactos, adaptación y vulnerabilidad – Resumen para responsables de políticas. Retrieved from Ginebra, Suiza:
- Iyer, P., Bruns, M. A., Zhang, H., Van Ginkel, S., & Logan, B. E. (2004). H<sub>2</sub>-Producing bacterial communities from a heat-treated soil inoculum. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(2), 166-173. doi:10.1007/s00253-004-1666-7
- Juárez, S., & Castro, A. (2013). Factibilidad técnica y económica de la producción de hidrógeno a partir de lodos del tratamiento de agua y otros desechos. *Tecnología y ciencias del agua*, 4, 137-147.
- Kapdan, I. K., & Kargi, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(5), 569-582. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.09.015>
- Kawagoshi, Y., Hino, N., Fujimoto, A., Nakao, M., Fujita, Y., Sugimura, S., & Furukawa, K. (2005). Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(5), 524-530. doi:<http://dx.doi.org/10.1263/jbb.100.524>
- Khanal, S. K., Chen, W.-H., Li, L., & Sung, S. (2004). Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(11), 1123-1131. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2003.11.002>
- Kim, J. K., Nhat, L., Chun, Y. N., & Kim, S. W. (2008). Hydrogen production conditions from food waste by dark fermentation with *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(4), 499-504. doi:10.1007/s12257-008-0142-0
- Lin, C. Y., & Lay, C. H. (2004). Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(1), 41-45. doi:[https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00083-1](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00083-1)

- Lin, Y.-H., Juan, M.-L., & Hsien, H.-J. (2011). Effects of temperature and initial pH on biohydrogen production from food-processing wastewater using anaerobic mixed cultures. *Biodegradation*, 22(3), 551-563. doi:10.1007/s10532-010-9427-z
- Lorenzo, Y., & Obaya, M. (2005). La digestión anaerobia: Aspectos teóricos Parte I. ICIDCA. *Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 39(1), 35-48.
- Madigan, M. T. (2009). Brock, biología de los microorganismos. 12/e: Pearson Educación.
- Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., & Noike, T. (2000). Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresource Technology*, 73(1), 59-65. doi:https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00130-3
- Mohammadi, P., Ibrahim, S., & Annuar, M. S. M. (2012). Comparative study on the effect of various pretreatment methods on the enrichment of hydrogen producing bacteria in anaerobic granulated sludge from brewery wastewater. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 29(10), 1347-1351. doi:10.1007/s11814-012-0018-z
- Morales, S. A., Rizo, P., Hernández, M. E., & Dávila, J. A. (2015). Producción de biohidrógeno en un reactor continuo UASB. *Revista Cubana de Química*, 27, 65-78.
- Moreno, I., Moreno, G., Kumar, G., & Buitrón, G. (2015). Biohydrogen production from industrial wastewaters. *Water Science and Technology*, 71(1), 105.
- Moreno-Andrade, I., & Buitrón, G. (2004). Influence of the origin of the inoculum on the anaerobic biodegradability test. *Water Science and Technology*, 49(1), 53.
- Mu, Y., Yu, H.-Q., & Wang, G. (2007). Evaluation of three methods for enriching H<sub>2</sub>-producing cultures from anaerobic sludge. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 947-953. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.033
- Nagaraja, T. G. (2016). Microbiology of the rumen. In *Rumenology* (pp. 39-61). Cham: Springer International Publishing.

- Pakarinen, O., Lehtomäki, A., & Rintala, J. (2008). Batch dark fermentative hydrogen production from grass silage: The effect of inoculum, pH, temperature and VS ratio. International Journal of Hydrogen Energy, 33(2), 594-601. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.10.008>
- Pehlivanoglu-Mantas, E., Okutman Tas, D., Insel, G., Aydin, E., Ozturk Duygu, C., Olmez, T., . . . Orhon, D. (2007). Evaluation of Municipal and Industrial Wastewater Treatment Sludge Stabilization in Istanbul. CLEAN – Soil, Air, Water, 35(6), 558-564. doi:10.1002/clen.200700101
- Ramalho, R. (2003). Tratamiento de aguas residuales. España: Reverté.
- Ramos, C., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., & Chamy, R. (2012). Effect of the initial total solids concentration and initial pH on the bio-hydrogen production from cafeteria food waste. International Journal of Hydrogen Energy, 37(18), 13288-13295. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.06.051>
- Ransom-Jones, E., Jones, D. L., McCarthy, A. J., & McDonald, J. E. (2012). The Fibrobacteres: an Important Phylum of Cellulose-Degrading Bacteria. Microbial Ecology, 63(2), 267-281. doi:10.1007/s00248-011-9998-1
- Reith, J. H., Wijffels, R., & Barten, H. (2003). Bio-methane and bio-hydrogen: Status and perspectives of biological methane and hydrogen production. ISBN : 9090171657.
- Ren, N.-Q., Guo, W.-Q., Wang, X.-J., Xiang, W.-S., Liu, B.-F., Wang, X.-Z., . . . Chen, Z.-B. (2008). Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy, 33(16), 4318-4324. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.06.003>
- Reyhani, S. K., & Zilouei, H. (2013). Enhanced biohydrogen production from wastewater and the influence of operating parameters. International Journal of Green Energy, 10(3), 321-336. doi:10.1080/15435075.2011.647164
- Rieu-Lesme, F., Dauga, C., Morvan, B., Bouvet, O. M. M., Grimont, P. A. D., & Doré, J. (1996). Acetogenic coccoid spore-forming bacteria isolated from the rumen.

Research in Microbiology, 147(9), 753-764. doi:[https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(97\)85122-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(97)85122-4)

Rieu-Lesme, F., Morvan, B., Collins, M. D., Fonty, G., & Willems, A. (1996). A new H<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-using acetogenic bacterium from the rumen: Description of Ruminococcus schinkii sp. Microbiology Letters, 140(2), 281-286. doi:[https://doi.org/10.1016/0378-1097\(96\)00195-4](https://doi.org/10.1016/0378-1097(96)00195-4)

Ruggeri, B., Tommasi, T., & Sanfilippo, S. (2015a). Energy sustainability evaluation of anaerobic digestion. En BioH<sub>2</sub> & BioCH<sub>4</sub> through anaerobic digestion: from research to full-scale applications (pp. 193-212). London: Springer London.

Ruggeri, B., Tommasi, T., & Sanfilippo, S. (2015b). Hydrogen production from biowaste. En BioH<sub>2</sub> & BioCH<sub>4</sub> through anaerobic digestion: from research to full-scale applications (pp. 107-135). London: Springer London.

Ruggeri, B., Tommasi, T., & Sanfilippo, S. (2015c). Ecological Mechanisms of Dark H<sub>2</sub> Production by a Mixed Microbial Community. En BioH<sub>2</sub> & BioCH<sub>4</sub> through anaerobic digestion: from research to full-scale applications (pp. 1-24). London: Springer London.

Saady, N. M. C. (2013). Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. International Journal of Hydrogen Energy, 38(30), 13172-13191. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>

Schuchmann, K., & Müller, V. (2016). Energetics and application of heterotrophy in acetogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 82(14), 4056-4069. doi:10.1128/AEM.00882-16

SENER. (2016). Balance Nacional de Energía 2015. México: [http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/177621/Balance\\_Nacional\\_de\\_Energ\\_a\\_2015.pdf](http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/177621/Balance_Nacional_de_Energ_a_2015.pdf)

Singh, V., C. Phuleria, H., & Chandel, M. (2017). Thermal investigation and FTIR analysis of sewage sludge generated from municipal wastewater treatment plants in India. Thermochemica Acta. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2018.05.023>

- Sinha, P., & Pandey, A. (2011). An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy, 36(13), 7460-7478. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.077>
- Tchobanoglous, G., Burton, F. L., Stensel, H. D., Metcalf, & Eddy, I. (2003). Wastewater Engineering: Treatment and Reuse: McGraw-Hill Education.
- Valdez-Vazquez, I., & Poggi-Varaldo, H. M. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 13(5), 1000-1013. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2008.03.003>
- Valdez-Vazquez, I., Ponce-Noyola, M. T., & Poggi-Varaldo, H. M. (2009). Nutrients related to spore germination improve H<sub>2</sub> production from heat-shock-treated consortia. International Journal of Hydrogen Energy, 34(10), 4291-4295. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.09.074>
- Wang, C. C., Chang, C. W., Chu, C. P., Lee, D. J., Chang, B. V., & Liao, C. S. (2003a). Hydrogen production from wastewater sludge using a clostridium strain. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 38(9), 1867-1875. doi:10.1081/ESE-120022885
- Wang, C. C., Chang, C. W., Chu, C. P., Lee, D. J., Chang, B. V., & Liao, C. S. (2003b). Producing hydrogen from wastewater sludge by Clostridium bifermentans. Journal of Biotechnology, 102(1), 83-92. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00007-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00007-5)
- Wang, J., & Wan, W. (2008). Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. International Journal of Hydrogen Energy, 33(12), 2934-2941. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.03.048>
- Wang, J., & Yin, Y. (2017). Enrichment of Hydrogen-Producing Microorganisms. En Biohydrogen Production from Organic Wastes (pp. 69-121). Singapore: Springer Singapore.
- Wang, Y.-Y., Ai, P., Hu, C.-X., & Zhang, Y.-L. (2011). Effects of various pretreatment methods of anaerobic mixed microflora on biohydrogen production and the

fermentation pathway of glucose. International Journal of Hydrogen Energy, 36(1), 390-396. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.09.092>

Werle, S., & Dudziak, M. (2014). Analysis of organic and inorganic contaminants in dried sewage sludge and by-products of dried sewage sludge gasification. Energies, 7, 462-76.

Wongthanate, J., Chinnacotpong, K., & Khumpong, M. (2014). Impacts of pH, temperature, and pretreatment method on biohydrogen production from organic wastes by sewage microflora. International Journal of Energy and Environmental Engineering, 5(1), 6. doi:10.1186/2251-6832-5-6

Wu, C.-w., Spike, T., Klingeman, D. M., Rodriguez, M., Bremer, V. R., & Brown, S. D. (2017). Generation and Characterization of Acid Tolerant Fibrobacter succinogenes S85. Scientific Reports, 7(1), 2277. doi:10.1038/s41598-017-02628-w

Wu, S. Y., Hung, C. H., Lin, C. N., Chen, H. W., Lee, A. S., & Chang, J. S. (2005). Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge. Biotechnology and Bioengineering, 93(5), 934-946. doi:10.1002/bit.20800

Xiao, B., & Liu, J. (2009). Effects of various pretreatments on biohydrogen production from sewage sludge. Chinese Science Bulletin, 54(12), 2038-2044. doi:10.1007/s11434-009-0100-z