



**EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROGENÓNICA
ESPECÍFICA - AHE COMO HERRAMIENTA PARA LA SELECCIÓN DE INÓCULOS EN LA
FERMENTACIÓN OSCURA DEL AGUA RESIDUAL DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE
ALMIDÓN DE YUCA**

CRISTIAN DAVID CARDENAS URBANO 1103684

**Trabajo de investigación para optar al título de Maestría en Ingeniería Énfasis en Ingeniería
Sanitaria y Ambiental**

DIRECTORAS

ING. JENNY ALEXANDRA RODRÍGUEZ V., Dra
Universidad del Valle

ING. TATIANA RODRÍGUEZ CHAPARRO., Ph.D
Universidad Militar Nueva Granada

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA DE RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE
POSGRADO EN INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL
SANTIAGO DE CALI
2019**



**EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROGENÓNICA ESPECÍFICA -
AHE COMO HERRAMIENTA PARA LA SELECCIÓN DE INÓCULOS EN LA FERMENTACIÓN OSCURA
DEL AGUA RESIDUAL DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA**



“Dad al hombre salud y metas a alcanzar y no se detendrá a pensar sobre si es o no feliz”

— George Bernard Shaw

LISTA DE ABREVIATURAS

AGV's:	Ácidos grasos volátiles
AHE:	Actividad Hidrogenónica Específica
AME:	Actividad Metanogénica Específica
AR:	Agua residual
ARD:	Agua residual doméstica
ARY:	Agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca
atm:	Atmósfera
CaCO₃:	Carbonato de calcio
CH₄:	Metano
CO₂:	Dióxido de carbono
d:	Día
DA:	Digestión Anaerobia
DQO:	Demanda Química de Oxígeno
FO:	Fermentación oscura
g:	Gramo
h:	Hora
HCl:	Ácido clorhídrico
H₂:	Hidrógeno
H₂SO₄:	Ácido sulfúrico
K:	Kelvin
kg:	Kilogramo
L:	Litro
LAA:	Lodo Anaerobio Acidogénico
LAF:	Lodo Anaerobio Floculento
LAGM:	Lodo Anaerobio Granular Metanogénico
mg:	Miligramo
N:	Normalidad
NaOH:	Hidróxido de Sodio
Na₂HPO₄:	Fosfato de Sodio
P:	Producción potencial de hidrógeno
R_m:	Tasa máxima de producción de hidrógeno
SP:	Sin pretratamiento
SSV:	Sólidos suspendidos volátiles
SST:	Sólidos suspendidos totales
TRH:	Tiempo de retención hidráulico
UASB:	Del inglés <i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i> . (Reactor anaerobio de flujo ascendente con manto de lodos)
°C:	Grados Celsius
λ:	Fase de latencia
Y:	Rendimiento de Biogás
%:	Porcentaje



AGRADECIMIENTOS

Al creador de lo que existe

A mi familia

A la Universidad del Valle

Al Grupo de Investigación Estudio y Control de la Contaminación Ambiental – ECCA

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – COLCIENCIAS por el apoyo con el programa Joven Investigador

A la profesora Jenny Rodríguez, por su paciencia, enseñanza, apoyo y compromiso

A la profesora Tatiana Rodríguez Chaparro y a la Universidad Militar Nueva Granada, por su asesoría y apoyo en la práctica académica de cromatografía de gases

A la profesora Patricia Torres, por su apoyo

A Dairon Muñoz y Manuel Hurtado, por su aporte en la etapa experimental

A Kevin Foronda, por su apoyo en la etapa experimental

Al señor Jorge Irne, propietario rallandería de yuca en el Corregimiento de Mondomo, por su apoyo en la obtención de ARY

Al Ingeniero Mario Moncaleano y a la Central de Abastecimiento del Valle del Cauca- CAVASA, por su apoyo en la obtención del LAGM y LAA.

A Tatiana Mañunga, por su apoyo y asesoramiento

A Angélica Franco, por su apoyo

A mis amigos Karen Bueno, Liseth Enriquez, Brayan Parra, Andrés Torres y Marcela Campo

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1 INTRODUCCIÓN	3
2 OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo general	6
2.2 Objetivos específicos	6
3 MARCO REFERENCIAL.....	7
3.1 Fuentes de energía renovable.....	7
3.2 Hidrógeno: características, usos y formas de producción	8
3.3 Digestión Anaerobia	10
3.4 Producción de H ₂ a través de la etapa fermentativa de la DA o fermentación oscura-FO	14
3.4.1 Inóculo	17
3.4.1.1 Pretratamiento térmico	19
3.4.2 Sustrato	21
3.4.2.1 Agua residual agroindustrial del proceso de extracción de almidón de yuca	22
3.4.3 Otros factores asociados con la producción de H ₂ a través de la FO.....	24
3.4.3.1 Temperatura.....	24
3.4.3.2 pH.....	25
3.4.3.3 Presión parcial.....	26
3.5 Consideraciones finales	27
4 MATERIALES Y METODOS.....	29
4.1 Fase I: Evaluación del efecto del pretratamiento térmico sobre la AHE de tres inóculos, a tres magnitudes de temperatura y de tiempo de exposición	29
4.1.1 Selección, recolección y caracterización de inóculos para ensayos de AHE	30
4.1.2 Adaptación de inóculos al sustrato para ensayos de AHE	32
4.1.3 Pretratamiento térmico de inóculos para ensayos de AHE	33
4.1.4 Ensayos de AHE.....	33
4.1.4.1 Sustrato y medio de reacción para los ensayos de AHE	35
4.1.4.2 Seguimiento y evaluación del efecto del pretratamiento térmico	37
4.2 Fase II: Estimación de la producción potencial de H ₂ en la FO del ARY.....	37
4.2.1 Recolección y caracterización de ARY	38
4.2.2 Adaptación del inóculo con mayor AHE y rendimiento en la producción de H ₂	39
4.2.3 Pretratamiento térmico del inóculo para ensayos de FO del ARY.....	40
4.2.4 Ensayos de producción de H ₂ a través de la FO del ARY	40
4.2.4.1 Sustrato y medio de reacción para los ensayos de producción de H ₂ a través de la FO... ..	40
4.2.4.2 Seguimiento y estimación de la producción potencial de hidrógeno en la FO del ARY	41

4.3	Cálculos.....	41
4.4	Análisis estadístico	43
4.4.1	Descripción del modelo estadístico Fase I:	43
5	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	44
5.1	Evaluación del efecto del pretratamiento térmico sobre la AHE de tres inóculos.....	44
5.1.1	Características de los inóculos	44
5.1.2	Ensayo previo de AHE a 48H de Fermentación	47
5.1.3	Efecto del pretratamiento térmico sobre la AHE de tres inóculos.....	54
5.1.3.1	Comportamiento de la presión ejercida por el biogás	54
5.1.3.2	Análisis cinético del ensayo de AHE para tres inóculos	58
5.1.3.3	Correlación de las características de la fase gaseosa con la fase líquida	65
5.1.4	Selección de la mejor combinación de T y t para el pretratamiento térmico.....	69
5.2	Estimación de la producción potencial de H ₂ en la FO del ARY	74
5.2.1	Características del inóculo y ARY	74
5.2.2	Comportamiento de la presión ejercida por el biogás.....	75
5.2.3	Estimación de la producción de H ₂ a través de la FO del ARY	76
5.2.4	Características de la fase líquida en la FO del ARY y rendimiento de producción de H ₂	79
6	CONCLUSIONES	81
7	RECOMENDACIONES	83
8	REFERENCIAS.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntesis gráfica de las fuentes de energía renovable	7
Figura 2. Principales métodos para la producción de Hidrógeno	9
Figura 3. Procesos biológicos para la producción de H ₂	10
Figura 4. Interacciones metabólicas y microorganismos involucrados en la DA.....	12
Figura 5. Principales rutas metabólicas en la FO.....	15
Figura 6. Representación gráfica de la transición de una espora a célula activa	20
Figura 7. Relaciones entre la magnitud de temperatura y el tiempo de exposición, sobre la efectividad del pretratamiento térmico de un inóculo.....	21
Figura 8. Esquema general del proceso de extracción de almidón de yuca.....	22
Figura 9. Efecto de la presión parcial de hidrógeno sobre su producción en la etapa fermentativa de la DA ..	27
Figura 10. Ubicación geográfica de la zona de estudio	29
Figura 11. Actividades ejecutadas en cumplimiento de los objetivos planteados	30
Figura 12. Adaptación de inóculos a sustrato para ensayos de AHE	33
Figura 13. Pretratamiento térmico de inóculos para ensayos de AHE: (a) y (b) , Retiro de sobrenadante del inóculo adaptado; (c) , toma de muestra de inóculo; (d) , Determinación de SST; (e) , Determinación de SSV; (f) y (g) , adición de inóculo a bandejas de aluminio; (h) e (i) , Pretratamiento térmico en horno.....	34
Figura 14. Unidad experimental, ensayo de AHE. (a) , Montaje; (b) , Unidad de absorción de CO ₂ , septa plástica y agrafe metálico; (c) , Cierre tipo serológico.	35
Figura 15. Configuración experimental de los ensayos de AHE: (a) y (b) Ensayo previo 2 Inóculos 48h + Reactores Control y Blanco; (c) y (d) Ensayos de AHE tres inóculos + Reactores Control y Blanco	36
Figura 16. Ensayo de AHE: (a) Inóculo Pretratado; (b) y (c) Preparación de solución de Macro/Micronutrientes; (d) Preparación de sustrato; (e) ajuste de pH Inóculo+Sustrato+ Macro/Micronutrientes; (f) y (g) adición de medio de reacción(Inóculo+Sustrato+ Macro/Micronutrientes) a los reactores, adición de perlas de NaOH y sellado hermético; (h) e (i) fermentación a 35°C; (j) medición de presión; (k) y (l) viales al vacío; (m) toma de muestra de biogás.	38
Figura 17. Agua residual generada en el proceso de extracción de almidón de yuca: (a) Punto de recolección (canal de la mancha); (b) y (c) Muestra en el laboratorio para ensayos de producción de H ₂ a través de la FO.	39
Figura 18. Configuración experimental de los ensayos de producción de H ₂ a través de la FO del ARY: (a) Ensayo Inicial de producción de H ₂ + Reactores Control y Blanco; (b) , Ensayo confirmatorio.....	41
Figura 19. Curva típica estimada Ecuación de Gompertz Fuente: (Akutsu, Lee, Li, & Noike, 2009)	42
Figura 20. Apariencia de los Inóculos utilizados: (a) y (b) LAGM; (c) y (d) LAF; (e) y (f) LAA.....	45
Figura 21. Curvas ensayos de AME de los inóculos seleccionados	46
Figura 22. Presión ejercida por el biogás para cada pretratamiento térmico del LAGM y LAF, durante un tiempo de fermentación de 48h. (a) LAGM, (b) LAF	48
Figura 23. Composición del biogás para cada pretratamiento térmico del LAGM y LAF. (a) LAGM, (b) LAF .	49
Figura 24. Porcentaje de Reducción de DQO, Carbohidratos y H _{max} H ₂ para cada pretratamiento térmico del LAGM y LAF, finalizado el tiempo de fermentación de 48h. (a) LAGM, (b) LAF	51
Figura 25. pH y concentración de AGVs para cada pretratamiento térmico del LAGM y LAF, finalizado el tiempo de fermentación de 48h. (a) LAGM, (b) LAF	52
Figura 26. Presión ejercida por el biogás en la AHE del LAGM. Pretratamientos: (a) 75°C -15,30 y 45min; (b) 85°C -15,30 y 45min, (c) 100°C -15,30 y 45min y (d) LAGM SP- Sin pretratamiento.....	55
Figura 27. Presión ejercida por el biogás en la AHE del LAF. Pretratamientos: (a) 75°C -15,30 y 45min; (b) 85°C -15,30 y 45min, (c) 100°C -15,30 y 45min y (d) LAF SP- Sin pretratamiento. Nota: R1: Replica 1, R2: Replica 2.....	56

Figura 28. Presión ejercida por el biogás en la AHE del LAA. Pretratamientos: (a) 75°C -15,30 y 45min; (b) 85°C -15,30 y 45min, (c) 100°C -15,30 y 45min y (d) LAA SP- Sin pretratamiento	58
Figura 29. Producción de biogás*H ₂ en la AHE del LAGM. Pretratamientos: (a) 75°C -15,30 y 45min; (b) 85°C -15,30 y 45min, (c) 100°C -15,30 y 45min y (d) LAGM SP- Sin pretratamiento.....	59
Figura 30. Distribución de los valores mínimos y máximos para los parámetros cinéticos del LAGM. (a) P; (b) Rm y (c) λ.	60
Figura 31. Producción de biogás*H ₂ en la AHE del LAF. Pretratamientos: (a) 75°C -15,30 y 45min; (b) 85°C -15,30 y 45min, (c) 100°C -15,30 y 45min y (d) LAF SP- Sin pretratamiento	61
Figura 32. Distribución de los valores mínimos y máximos para los parámetros cinéticos del LAF. (a) P; (b) Rm y (c) λ.	63
Figura 33. Producción de biogás*H ₂ en la AHE del LAA. Pretratamientos: (a) 75°C -15,30 y 45min; (b) 85°C -15,30 y 45min, (c) 100°C -15,30 y 45min y (d) LAA SP- Sin pretratamiento	63
Figura 34. Distribución de los valores mínimos y máximos para los parámetros cinéticos del LAA. (a) P; (b) Rm y (c) λ.	65
Figura 35. Contenido de AGVs y producción máxima potencial P. (a) LAGM, (b) LAF y (c) LAA.	66
Figura 36. (a y b) Rendimiento de Biogás*H ₂ – Y, (c y d) Actividad Hidrogenónica Especifica - AHE o Tasa Especifica de producción de Biogás*H ₂ promedio para el LAGM, LAF y LAA.....	70
Figura 37. Comportamiento de la presión ejercida por el biogás en la FO del ARY en el Ensayo 1. (a) Tiempo de fermentación de 140h, (b) Acotación de la gráfica, hasta el tiempo de fermentación de 30h.....	75
Figura 38. (a) AME del LAA CP y SP, (b) Comparación grafica de la presión ejercida por el biogás en la AME y en la FO del LAA SP.	76
Figura 39. Producción de Biogás*H ₂ estimada para el LAA con y sin pretratamiento térmico – Ensayo 1.....	77
Figura 40. (a) Comportamiento de la presión ejercida por el biogás en la FO del ARY en el Ensayo 2. (b) producción estimada de biogás para las condiciones evaluadas.	78

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de propiedades de combustibles sintéticos	9
Tabla 2. Microorganismos y su rol en los procesos de fermentación	17
Tabla 3. Rendimientos de producción de H ₂ en diferentes estudios aplicando pretratamiento térmico.....	19
Tabla 4. Características fisicoquímicas del AR del proceso de extracción de almidón de yuca en diferentes estudios	23
Tabla 5. Inóculos utilizados en el estudio.....	30
Tabla 6. Caracterización inicial de los tres inóculos seleccionados	31
Tabla 7. Descripción de los criterios para la selección de Inóculos utilizados en el estudio	31
Tabla 8. Macro y micronutrientes adicionados a cada reactor en el ensayo de AHE.....	35
Tabla 9. Parámetros fisicoquímicos caracterizados para la fase líquida y gaseosa, finalizado el ensayo de AHE	37
Tabla 10. Estrategia de adaptación al sustrato, para los ensayos de FO de ARY	39
Tabla 11. Características cualitativas y cuantitativas de los inóculos utilizados.....	44
Tabla 12. Composición porcentual del biogás generado y estimación del volumen generado	50
Tabla 13. Parámetros cinéticos del LAGM para los diferentes pretratamientos, de acuerdo al modelo predictivo de Gompertz.....	59
Tabla 14. Parámetros cinéticos del LAF para los diferentes pretratamientos, de acuerdo al modelo predictivo de Gompertz.....	62
Tabla 15. Parámetros cinéticos del LAA para los diferentes pretratamientos, de acuerdo al modelo predictivo de Gompertz.....	64
Tabla 16. Caracterización fisicoquímica de la fase líquida al final del ensayo	65
Tabla 17. Rendimiento de Biogás*H ₂ y AHE promedio para el LAGM, LAF y LAA.....	69
Tabla 18. Eficiencia de conversión para los mejores rendimientos Y	71
Tabla 19. Análisis de varianza.....	72
Tabla 20. Prueba de significancia (post-ANOVA) LSD Fisher para las condiciones evaluadas.....	73
Tabla 21. Características físicoquímicas del inóculo adaptado a ARY	74
Tabla 22. Características físicoquímicas del ARY.....	75
Tabla 23. Producción máxima de Biogás*H ₂ estimada en la FO del ARY, Ensayo 1.....	77
Tabla 24. Producción máxima de Biogás*H ₂ estimada en la FO del ARY, Ensayo confirmatorio	78
Tabla 25. Composición del Biogás en la FO del ARY	79
Tabla 26. Características de la fase líquida en la FO del ARY, utilizando LAA pretratado	79

RESUMEN

El hidrógeno – H_2 es considerado como el combustible del futuro debido a su alto contenido energético y su naturaleza no contaminante; su producción a través de la fermentación oscura – FO es una alternativa atractiva desde el punto de vista económico y ambiental, en el cual el pretratamiento del inóculo constituye un factor de gran importancia para inhibir los microorganismos consumidores de este biogás y aumentar los rendimientos de producción.

Se evaluó el efecto del pretratamiento térmico sobre la Actividad Hidrogenónica Específica - AHE como herramienta para la selección de inóculos en la fermentación oscura - FO del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca – ARY. Los valores de Y y AHE indicaron que el Lodo Anaerobio Granular Metanogénico - LAGM y el Lodo Anaerobio Acidogénico - LAA con y sin pretratamiento térmico son factibles para ser utilizados como inóculo en ensayos de FO de sustratos complejos como el ARY. El LAGM y el LAA obtuvieron mayores valores promedio de Y ($mL\text{Biogás}H_2.(g\text{Glucosa}_{\text{Removida}})^{-1}$) respecto al LAF, según las condiciones de pretratamiento térmico evaluadas de temperatura – T (75, 85 y 100°C) y tiempo de exposición t (15, 30 y 45min). Estos valores fueron en su orden, para los seis valores más altos correspondientes a: **(i)** 289,0 (LAA 85°C -15min), **(ii)** 286,9 (LAA 75°C -15min), **(iii)** 277,0 (LAGM 75°C -45min), **(iv)** 276,7 (LAGM SP), **(v)** 269,7 (LAGM 75°C -30min) y **(vi)** 244,6 (LAA 85°C -30min).

En cuanto a la AHE ($mL\text{Biogás}.H_2(gSSV_{\text{Inicial}}.h)^{-1}$), los valores promedio fueron en su orden: **(i)** 27,3 (LAF 100°C -45min), **(ii)** 24,9 (LAA 85°C -15min), **(iii)** 23,8 (LAA 100°C -30min), **(iv)** 22,4 (LAF SP), **(v)** 18,8 (LAA 75°C -30min) y **(vi)** 18,0 (LAA 85°C -30min), destacándose que el LAF presentó el valor más alto de AHE, aunque su rendimiento de producción de biogás fue menor que el del LAGM y el LAA, indicando que no necesariamente existe una proporcionalidad entre estos dos parámetros, cuando se evalúan diferentes inóculos.

Se seleccionó el LAA pretratado a 85°C -15min como inóculo para estimar la producción potencial de H_2 en la FO del ARY, debido a que presentó el mayor rendimiento de producción de biogás. H_2 y una alta AHE, además de presentar una alta relación SV/ST (0,83) y alta capacidad en la transformación de carbohidratos (eficiencias de reducción predominantes del orden del 98%). Así mismo, teniendo en cuenta el análisis de los parámetros cinéticos para este inóculo, se incluyó la condición SP en los ensayos de FO del agua residual agroindustrial en referencia.

El rendimiento en la producción de H_2 en la FO del ARY fue de 30 y 19 $mL.(g\text{Glucosa}_{\text{Removida}})^{-1}$ (equivalente a 0,22 y 0,14 $molH_2.(mol\text{Glucosa}_{\text{Removida}})^{-1}$) utilizando LAA pretratado térmicamente a 85°C -15min y sin pretratamiento respectivamente, lo cual representó hasta un 10,5% de su producción potencial de H_2 . El bajo rendimiento de H_2 en la FO del ARY en relación con la producción potencial del LAA evidenció la influencia de otros factores que direccionan rutas metabólicas con producción nula de este biogás, como la posible presencia de bacterias ácido lácticas.

Palabras Clave: Agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, Fermentación oscura, Hidrógeno, Inóculo, pretratamiento térmico.

ABSTRACT

Hydrogen - H_2 is considered as “fuel for future” because of its high-energy yield and its non-polluting nature. Dark fermentative hydrogen production is attractive from economic and environmental perspective, in this respect, pretreatment is one of the most important issues in order to inhibit hydrogen- consuming bacteria – HCB.

The effect of heat pretreatment on the Specific Hydrogenic Activity (AHE) as a tool for the selection of inoculums in dark fermentative hydrogen from cassava processing wastewater – ARY was investigated. The values reached for Y and AHE showed that pretreated and unpretreated Granular Anaerobic Methanogenic Inoculum- LAGM and Acidogenic Anaerobic Inoculum - LAA are feasible to be used as inoculum in dark fermentative hydrogen production from complex substrates such as the ARY. LAGM and LAA obtained higher average hydrogen yields - Y ($mL_{Biogas.H_2} \cdot (g_{Glucosa_{Removida}})^{-1}$) compared to LAF, according to pretreatment conditions evaluated: Temperature - T (75, 85 and $100^\circ C$) and exposure time - t (15, 30 and 45 min). These values were in order, for the six highest: (i) 289,0 (LAA $85^\circ C$ -15min), (ii) 286,9 (LAA $75^\circ C$ -15min), (iii) 277,0 (LAGM $75^\circ C$ - 45min), (iv) 276,7 (LAGM SP), (v) 269,7 (LAGM $75^\circ C$ -30min) and (vi) 244,6 (LAA $85^\circ C$ -30min).

Average AHE ($mL_{Biogas.H_2} \cdot (g_{SSV_{Inicial} \cdot h})^{-1}$), were: (i) 27,3 (LAF $100^\circ C$ -45min), (ii) 24,9 (LAA $85^\circ C$ -15min), (iii) 23,8 (LAA $100^\circ C$ -30min), (iv) 22,4 (LAF SP), (v) 18,8 (LAA $75^\circ C$ -30min) and (vi) 18,0 (LAA $85^\circ C$ -30min); LAF reached the highest AHE, although its biogas production yield was lower than the LAGM and the LAA yield, indicating that there is not necessarily a proportionality between these two parameters, when different inocula are evaluated.

Pretreated LAA at $85^\circ C$ -15 min was selected as inoculum to estimate the potential dark fermentative hydrogen production from ARY, because of its highest hydrogen yield and AHE. Besides, LAA had a high SV/ST ratio (0,83) and high conversion of carbohydrates (predominant removal efficiencies around 98%). Taking into consideration the kinetic parameters for this inoculum, the untreated - SP condition was included in the dark fermentation from ARY.

The hydrogen yield in the dark fermentation from ARY was 30 and 19 $mL \cdot (g_{Glucosa_{Removida}})^{-1}$ (equivalent to 0,22 and 0,14 $molH_2 \cdot (mol_{Glucosa_{Removida}})^{-1}$) for pretreated LAA at $85^\circ C$ -15min and unpretreated LAA respectively, which represented up to 10,5% of its potential hydrogen yield production. The hydrogen yield in the dark fermentation from ARY in relation to the potential yield production of LAA showed the influence of other factors that direct metabolic routes with zero production of this type of biogas, such as the possible presence of lactic acid bacteria.

Keywords: Cassava processing wastewater, dark fermentation, heat pretreatment, hydrogen, inoculum.

1 INTRODUCCIÓN

La energía juega un papel importante para el bienestar humano y es crucial para el desarrollo económico de la sociedad moderna, en el cual el carbón, el petróleo y el gas natural son las fuentes de energía más significativas (Shahsavari & Akbari, 2018; Zhong et al., 2017), ya que representan más del 80% de la oferta total de energía primaria en el mundo (Abas et al., 2015; Agencia Internacional de la Energía - AIE, 2017b). Esta dependencia cada vez mayor de los combustibles fósiles ha contribuido al cambio climático y al calentamiento global, lo que ha tenido un impacto severo en el ambiente y la salud (Sen et al., 2016; Shahsavari & Akbari, 2018). Adicionalmente, la disponibilidad de combustibles fósiles está sujeta a grandes incertidumbres técnicas, económicas y políticas (Bauer et al., 2016); su explotación se ha realizado a tal magnitud, que algunos estudios señalan que las reservas se agotarán en un futuro no muy lejano, menos de un siglo o un poco más (Henrich et al., 2015; Patel & Shah, 2015). Lo anterior, ha impulsado la búsqueda de nuevas fuentes de energía, más limpias, sostenibles y ecológicas (Correa et al., 2017; Şenol et al., 2016) y ha producido un gran cambio de paradigma, en el que se ha pasado del pensamiento del sólo uso de los recursos naturales al concepto de recuperación, reutilización y conversión de residuos en energía (Paudel et al., 2017; Sen et al., 2016).

De esta forma, la energía y el ambiente, además de los aspectos económicos, son dos factores cruciales en el desarrollo sostenible (Vidadili et al., 2017). Bajo este escenario, entre las diferentes fuentes de energía renovable, el hidrógeno es considerado como el combustible del futuro debido principalmente, a su alto contenido energético y su naturaleza no contaminante (Elbeshbishy et al., 2017; Singh et al., 2015). Desafortunadamente, este gas es producido primordialmente, a partir de fuentes de energía no renovables como los combustibles fósiles (Dimitriou & Tsujimura, 2017; Serban et al., 2003), los cuales generan contaminación y aunque, se han catalogado como más económicos, a medida que se alcanzan economías de escala, los costos operacionales tienden a aumentar en comparación con el costo de las tecnologías basadas en fuentes de energía alternativa (nuclear, solar, eólica y biomasa) (Bartels et al., 2010), estas últimas pueden hacerse más competitivas teniendo en cuenta aspectos como la regulación ambiental, los subsidios y otros incentivos económicos por su implementación (Chynoweth et al., 2000; Cowley & Brorsen, 2018).

Una de las alternativas más atractivas para la producción de H_2 desde el punto de vista económico, ambiental y energético, lo constituye la digestión anaerobia-DA (Khan et al., 2018). La DA puede considerarse un ecosistema que involucra un proceso biológico complejo, no lineal y dinámico (Hu et al., 2018), en el cual un consorcio de diferentes tipos de microorganismos mutuamente dependientes, con diferentes condiciones de operación y rutas metabólicas específicas, promueven bajo ausencia de oxígeno molecular, la transformación de compuestos orgánicos como carbohidratos, proteínas y lípidos, en compuestos más simples como biogás y de fácil manipulación como biosólido (Campos, 1999; Uçkun Kiran et al., 2016; Fagbohunge et al., 2017; Siddique & Wahid, 2018). Esta característica ha hecho que la aplicación de la DA en el tratamiento de residuos líquidos y sólidos de origen doméstico e industrial, tenga gran aceptación a nivel mundial, ya que además de las ventajas ampliamente reconocidas como el bajo costo de implementación y operación y la baja producción de lodo de exceso, permiten la recuperación y utilización de los subproductos generados (Foresti et al., 2006; Sawatdeenarunat et al., 2016; Stazi & Tomei, 2018).

El actual contexto económico y ambiental, ha hecho que la DA deje de ser concebida netamente como una tecnología para el tratamiento de residuos y pase a ser considerada como una alternativa para la producción de energía (Premier et al., 2013; Sawatdeenarunat et al., 2016; Wilkinson, 2011). El aprovechamiento del metano que conforma el biogás producido (principalmente metano), ha sido reconocido por ser una estrategia favorable desde el punto de vista costo-beneficio en la producción de energía (Tabatabaei et al., 2010), pero su combustión genera CO_2 , que junto con el metano son considerados gases de efecto invernadero (Lin & Chang, 1999; Mannina et al., 2016). De esta manera, diversos estudios sobre la producción de biogás a través de la DA, han sido dirigidos hacia la producción de H_2 , ya sea como el componente principal en lugar del metano (Li & Fang, 2007), llevándose a cabo hasta la etapa fermentativa o de acidogénesis, cuyo proceso es denominado

“Fermentación oscura-FO” (Alibardi, Favaro, Lavagnolo, Basaglia, & Casella, 2012) o a la producción de los dos gases de forma simultánea o separada, ambos escenarios bajo condiciones específicas de operación (Arizzi et al., 2016; Duan et al., 2017; Khan et al., 2016; Lin et al., 2018).

De acuerdo con Li & Fang (2007) el H_2 aventaja al metano por dos razones principales, la primera consiste en que el H_2 tiene una amplia gama de aplicabilidad industrial comparada con el metano, el cual es usado principalmente como combustible, mientras que la segunda hace referencia a que el H_2 es un combustible ideal, que genera vapor de agua como producto de su combustión. A temperatura ambiente, el H_2 es un gas no tóxico, inodoro, incoloro, sin sabor y altamente combustible (Boodhun et al., 2017), tiene un valor calorífico neto 2,4, 2,7 y 4 veces más alto que el del metano, la gasolina y el carbón, respectivamente (Łukajtis et al., 2018; Marbán & Valdés-Solís, 2007). Entre los factores más importantes que influyen la producción de H_2 a través de la FO se encuentran las características del sustrato y del inóculo (Alibardi & Cossu, 2016; Dinesh, Chauhan, & Chakma, 2018; Łukajtis et al., 2018).

En cuanto al sustrato, aunque es posible utilizar diferentes sustancias orgánicas, como carbohidratos, proteínas y lípidos (Ntaikou et al., 2010), los monosacáridos glucosa y xilosa y los disacáridos sacarosa y lactosa, han sido los más utilizados debido a su alta biodegradabilidad, de los cuales la glucosa ha sido ampliamente aceptada como la sustancia de referencia para la estimación de los rendimientos de producción teórica (Lopez-Hidalgo et al., 2018; Łukajtis et al., 2018; Wang & Wan, 2009). No obstante, una de las desventajas en el uso de carbohidratos puros como la glucosa y sacarosa es que son sustancias con diferentes aplicaciones y usos, como el correspondiente al sector salud y alimenticio y en ese aspecto, existe un escenario de competencia, además de su costo elevado (Arimi et al., 2015; Kapdan & Kargi, 2006; Łukajtis et al., 2018).

Teniendo en cuenta que respecto al sustrato, el uso de materia prima económica y disponible es uno de los principales elementos para una producción eficiente de H_2 a escala industrial (Arimi et al., 2015), el agua residual con alto contenido de materia orgánica en forma de carbohidratos, como la generada en el proceso de extracción de almidón de yuca constituye una potencial alternativa para ser utilizada con ese objetivo (Cappelletti et al., 2011; Madeira et al., 2017; O-Thong et al., 2011). En Colombia, este tipo de agua residual ha sido reconocida por su alto impacto ambiental y se ha identificado la factibilidad de su tratamiento mediante DA (Pérez Vidal et al., 2009; Torres et al., 2010); de esta manera, su uso como sustrato en la producción biológica de H_2 a través de la FO permite contribuir de manera simultánea, a la solución de la problemática asociada con la contaminación ambiental y, con la necesidad de producción de energía limpia, con mayor poder calorífico (Wang & Yin, 2018; Yun et al., 2018).

Respecto al inóculo, en vista de los beneficios que presentan los cultivos mixtos de microorganismos sobre los cultivos puros, existe una gran variedad de fuentes como por ejemplo suelo, estiércol, compost, sedimentos de fuentes de agua superficial, lodo anaerobio y lodo activado de plantas de tratamiento de agua residual (Baghchehsaraee et al., 2008; Chang et al., 2011; Ghimire et al., 2015). El uso de cultivos mixtos presenta ventajas sobre el uso de cultivos puros, porque ofrecen menores costos operacionales, ya que no requieren condiciones estrictas de esterilidad en el proceso, posibilita el control operacional de acuerdo con la cinética de diferentes grupos microbiológicos y, permiten el uso de agua residual como sustrato (Chen et al., 2017; Valdez-Vazquez et al., 2005). Sin embargo, en un sistema con una comunidad diversa de microorganismos, coexisten bacterias productoras de H_2 facultativas como las del género *Enterobacter*, *Bacillus* y *Escherichia* o anaerobias estrictas como las del género *Clostridium* y, de otros microorganismos consumidores de H_2 de diversos géneros, principalmente *arqueas* metanogénicas y bacterias homoacetogénicas así como bacterias sulfatoreductoras, productoras de ácido propiónico y reductoras de nitrato (Bundhoo et al., 2015; Chang et al., 2011; Li & Fang, 2007). Una de las estrategias para lograr que durante la FO el H_2 no sea consumido por otros microorganismos, es el tratamiento previo del inóculo para suprimir los microorganismos consumidores de este biogás y que predominen aquellas que lo producen (Li & Fang, 2007; Braguglia, Gallipoli, Gianico, & Pagliaccia, 2018).

La selección del método o pretratamiento del inóculo para la inhibición de los microorganismos consumidores de H_2 depende principalmente del origen y características del inóculo, de las características del sustrato, de los costos de inversión y operación, de la factibilidad y complejidad técnica, afinidad con los microorganismos productores de H_2 y de la compatibilidad con el metabolismo de estos últimos (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009), por lo cual se han identificado ventajas, desventajas y resultados controversiales en la aplicación de cada uno de ellos (Dessi et al., 2018; Kumar et al., 2016; L. Singh & Wahid, 2015); en ese sentido, la optimización de los métodos de pretratamiento de inóculos mixtos constituyen una necesidad en pro de alcanzar mayores rendimientos en la producción de H_2 a través de la FO y a su vez, un desafío para su aplicación en un escenario a gran escala, el cual demanda grandes cantidades de inóculos activos y estables (Baghchehsaraee et al., 2008; Chang et al., 2011; L. Singh & Wahid, 2015).

De acuerdo con lo anterior, se hace necesario avanzar en la búsqueda de estrategias para la producción de H_2 a través de la FO que constituyan un insumo para su aplicación a escala real, utilizando como sustrato agua residual de alto impacto ambiental e inóculos de fácil adquisición en la región. En ese sentido, esta investigación evaluó el efecto del pretratamiento térmico sobre la Actividad Hidrogenónica Específica - AHE como herramienta para la selección del inóculos en la fermentación oscura del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. De esta manera, se espera contribuir al desarrollo de tecnologías sostenibles para el tratamiento de agua residual en el país y la minimización de los impactos en el ambiente por su inadecuada disposición; adicionalmente se espera aportar a la promoción de fuentes de energía alternativa con la consecuente valorización de residuos líquidos de la agroindustria y las potencialidades que para dicho objetivo tienen diferentes inóculos disponibles en la región del suroccidente colombiano.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del pretratamiento térmico sobre la Actividad Hidrogenónica Específica - AHE como herramienta para la selección de inóculos en la fermentación oscura del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la temperatura y del tiempo de exposición en el pretratamiento térmico, sobre la Actividad Hidrogenónica Específica- AHE de tres inóculos
- Seleccionar la mejor combinación de temperatura y tiempo de exposición para el pretratamiento térmico del inóculo de mayor AHE y rendimiento en la producción de H_2
- Estimar la producción potencial de hidrógeno en la fermentación oscura del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca

3 MARCO REFERENCIAL

3.1 Fuentes de energía renovable

El incremento exponencial de la población, el notable ascenso de la industrialización, la modernización en el estilo de vida y una sociedad cada vez “motorizada” ha llevado a un aumento significativo en la demanda de combustibles a base de petróleo (Agarwal, 2007; Joshi, Pandey, Rana, & Rawat, 2017; Sen et al., 2016). La demanda cada vez mayor en el uso de combustibles fósiles y la consecuente emisión de gases efecto invernadero derivado de su combustión, ha contribuido con el cambio climático, ha ocasionado un impacto severo en el ambiente y la salud (Nigam & Singh, 2011; Sen et al., 2016; Shahsavari & Akbari, 2018). Adicionalmente, la disponibilidad de combustibles fósiles está sujeta a grandes incertidumbres técnicas, económicas y políticas (Bauer et al., 2016); su explotación se ha realizado a tal magnitud, que algunos estudios señalan que las reservas se agotarán en un futuro no muy lejano, menos de un siglo o un poco más (Henrich et al., 2015; Patel & Shah, 2015). Lo anterior, ha impulsado la búsqueda de nuevas fuentes de energía, más limpias, sostenibles y ecológicas (Correa et al., 2017; Şenol et al., 2016).

Las fuentes de energía renovable, también llamadas fuentes de energía alternativa (Panwar, Kaushik, & Kothari, 2011), son aquellas que se reponen continuamente por la naturaleza y se derivan directamente del sol como la energía térmica, fotoquímica y fotoeléctrica, indirectamente del sol como la eólica, hidroeléctrica y la energía fotosintética almacenada en la biomasa, o de otros movimientos naturales y mecanismos del ambiente como la energía geotérmica y mareomotriz (Ellabban, Abu-Rub, & Blaabjerg, 2014). La **Figura 1** muestra una clasificación general de las fuentes de energía renovable, dentro de las cuales se encuentra la bioenergía o energía de la biomasa.

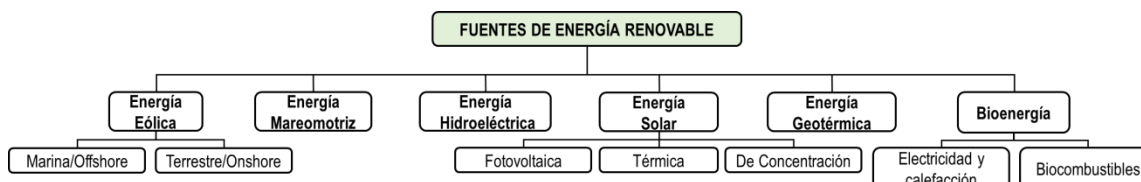


Figura 1. Síntesis gráfica de las fuentes de energía renovable
Fuente: Ellabban et al. (2014)

Bioenergía es energía renovable disponible a partir de materiales derivados de fuentes biológicas (Patel & Shah, 2015), específicamente, es la conversión de biomasa en formas útiles de energía (Ellabban et al., 2014). Por su parte, Biomasa es cualquier material orgánico que ha almacenado la luz solar en forma de energía química (Patel & Shah, 2015). No obstante, la biomasa utilizada con fines energéticos tiene una categoría muy heterogénea (Vávrová, Knápek, & Weger, 2017), y puede considerarse como cualquier recurso renovable derivado de material orgánico de origen animal o vegetal, existente en la naturaleza o generado por el hombre y/o los animales (residuos de actividades agrícolas, industriales y urbanos) (Ferreira et al., 2018).

Si bien, la biomasa puede utilizarse directamente para obtener energía (combustión), también puede utilizarse como materia prima para convertirse en diversos combustibles líquidos o gaseosos (biocombustibles). Los biocombustibles pueden ser transportados y almacenados, permitiendo por ejemplo la generación de calor y energía según la demanda, lo cual es esencial bajo un escenario de combinación energética con otras fuentes de energía altamente dependientes o intermitentes como la eólica (Ellabban et al., 2014).

Los biocombustibles incluyen cualquier compuesto químico en estado líquido, sólido o gaseoso, enriquecido en energía que es generado directamente a través de procesos biológicos o derivado de la conversión química

de biomasa de organismos vivos como algas, plantas y bacterias (Rodionova et al., 2017). Los biocombustibles provenientes especialmente de biomasa de cultivos agrícolas destinados a la alimentación humana, son denominados de primera generación (Bioetanol, Biodiesel y Biogás). Para que la producción de biocombustibles no compita con la producción de alimentos, se han propuesto los biocombustibles de segunda generación, los cuales son producidos a partir de biomasa lignocelulósica, procedente de residuos de cultivos, de subproductos de las industrias alimentaria y forestal, o de cultivos específicamente destinados a su obtención como las algas (Algayyim, Wandel, Yusaf, & Hamawand, 2018; Bhatia, Kim, Yoon, & Yang, 2017; Nigam & Singh, 2011, Saladini et al., 2016).

De los diversos procesos, métodos y tecnologías para la producción de biocombustibles de segunda generación, la DA, es una opción atractiva, con potenciales beneficios ambientales y económicos y el biocombustible producido (Biogás) es reconocido por su versatilidad, aceptación y racionalidad desde el punto de vista de la sostenibilidad ambiental y económica (Bharathiraja, Sudharsanaa, Bharghavi, Jayamuthunagai, & Praveenkumar, 2016; Paudel et al., 2017). El biogás es una mezcla compuesta principalmente de metano CH_4 , entre un 50% y 75%, dióxido de carbono entre un 25% y 50% y cantidades mínimas de otros compuestos como sulfuro de hidrógeno, hidrógeno y vapor de agua (Bharathiraja et al., 2016; Surendra, Takara, Hashimoto, & Khanal, 2014).

No obstante, los estudios recientes en el campo de la DA, han dirigido sus esfuerzos hacia la “recuperación” del hidrógeno que se produce durante el proceso, debido a sus numerosas ventajas respecto al metano y los combustibles fósiles, por lo cual ha sido considerado como un “Biocombustible promisorio” (Hallenbeck, 2009; Imam, Singh, & Shukla, 2014; G. Kumar, Bakonyi, et al., 2016).

3.2 Hidrógeno: características, usos y formas de producción

El Hidrógeno es el más ligero de todos los elementos, fue descubierto por Henry Cavendish en Inglaterra en 1766 y nombrado por Lavoisier. Su nombre proviene de la combinación de las palabras griegas “*Hidro*” que significa “agua” y “*geinomai*” que significa “generador de”, es decir, el elemento que “genera agua” (Lide, 2005; Salvi & Subramanian, 2015).

El hidrógeno constituye aproximadamente las tres cuartas partes de toda la materia del universo, además de ser el más ligero, es el elemento más simple y abundante de todos los elementos químicos existentes en él (Acar & Dincer, 2014; Sharma & Arya, 2017), constituye el décimo elemento más abundante en la corteza terrestre (Baykara, 2018), no se encuentra disponible en la naturaleza como sustancia química con fórmula molecular H_2 , solo se encuentra en combinación con otros elementos, principalmente con oxígeno en la molécula de agua, con carbono y oxígeno de la biomasa ($\text{C}_x\text{H}_y\text{O}_z$) y combustibles fósiles (C_xH_y) (Abdalla et al., 2018; Acar & Dincer, 2014; Salvi & Subramanian, 2015); no es una fuente de energía primaria, sin embargo se convierte en un atractivo portador de energía cuando se separa de los demás elementos con los cuales esta combinado (Acar & Dincer, 2014).

A temperatura ambiente, el H_2 es un gas no tóxico, inodoro, incoloro, insípido y altamente combustible, con fórmula molecular H_2 (Boodhun et al., 2017). La combinación y reacción de dos átomos de hidrógeno y un átomo de oxígeno conducen a la liberación de energía y la formación de agua solamente, siendo inocuo al ambiente; presenta ventajas tales como alta eficiencia energética, producción de agua sin emisiones, abundancia, diferentes formas de almacenamiento (gaseosa, líquida o junto con hidruros metálicos), facilidad de conversión a otras formas de energía y mayor valor calorífico neto que la mayoría de los combustibles fósiles convencionales (Dimitriou & Tsujimura, 2017; Dincer & Acar, 2014), como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Comparación de propiedades de combustibles sintéticos

Combustible	Valor Calorífico Neto - VCN (kJ/g)	Cantidad Relativa para igualar el VCN del H ₂
Hidrógeno (H ₂)	120	1,0
Metano (CH ₄)	50	2,4
Metanol (CH ₃ OH)	20,1	6,0
Etanol (C ₂ H ₅ OH)	26,8	4,4
Gasolina (C ₈ H ₁₈)	46,7	2,7

Fuente: Zajic et al. (1978), Łukajtis et al. (2018)

El H₂ se puede producir a partir de un gran número de materias primas tales como combustibles fósiles y fuentes renovables (F. Zhang, Zhao, Niu, & Maddy, 2016) tal como se presenta en la **Figura 2**.

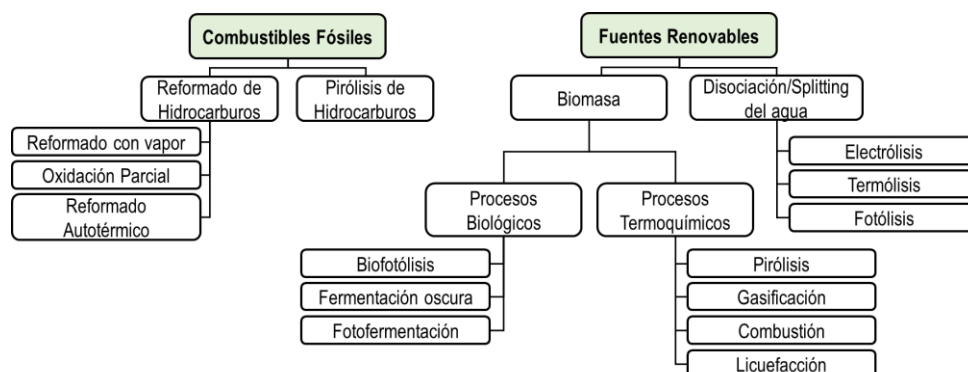


Figura 2. Principales métodos para la producción de Hidrógeno

Fuente: Nikolaidis & Poullikkas (2017)

De acuerdo con la Agencia Internacional de las Energías Renovables-IRENA (2018), actualmente, más del 95% de la producción de H₂ tiene como fuente los combustibles fósiles; siendo el gas natural la fuente más común (48%) a través del método de reformado, frente a las fuentes de petróleo (30%) y carbón (18%). Estas dos últimas fuentes, también se utilizan ampliamente, especialmente en China y Australia mediante métodos de gasificación; así mismo, alrededor del 4% del suministro global de H₂ se produce mediante electrólisis, principalmente a través de procesos de cloro-álcali.

Aspectos como el costo de producción y los efectos adversos al ambiente derivados de la producción de H₂ a partir de recursos no renovables basados en carbón, constituyen un desafío para el desarrollo de este sector (Show, Lee, Tay, Lin, & Chang, 2012); bajo este panorama la producción biológica es considerada como una opción atractiva (Sivagurunathan et al., 2016), en el cual al Hidrogeno se le ha acuñado el término de Biohidrógeno. Estos procesos son potencialmente neutros en carbono y son llevados a cabo a bajos intervalos de temperatura y presión, por lo tanto son menos intensivos energéticamente que los procesos convencionales y permiten la utilización de residuos como sustrato (Azbar, 2015; Nikolaidis & Poullikkas, 2017); se pueden agrupar en dos categorías generales: i) procesos dependientes de energía lumínica y, ii) procesos no dependientes de energía lumínica; la primera incluye fotólisis directa o indirecta y foto-fermentación, mientras que la segunda categoría incluye principalmente la fermentación oscura (Ghimire et al., 2015; Show et al., 2012). La **Figura 3** muestra una representación gráfica de algunos procesos biológicos para la producción de H₂.

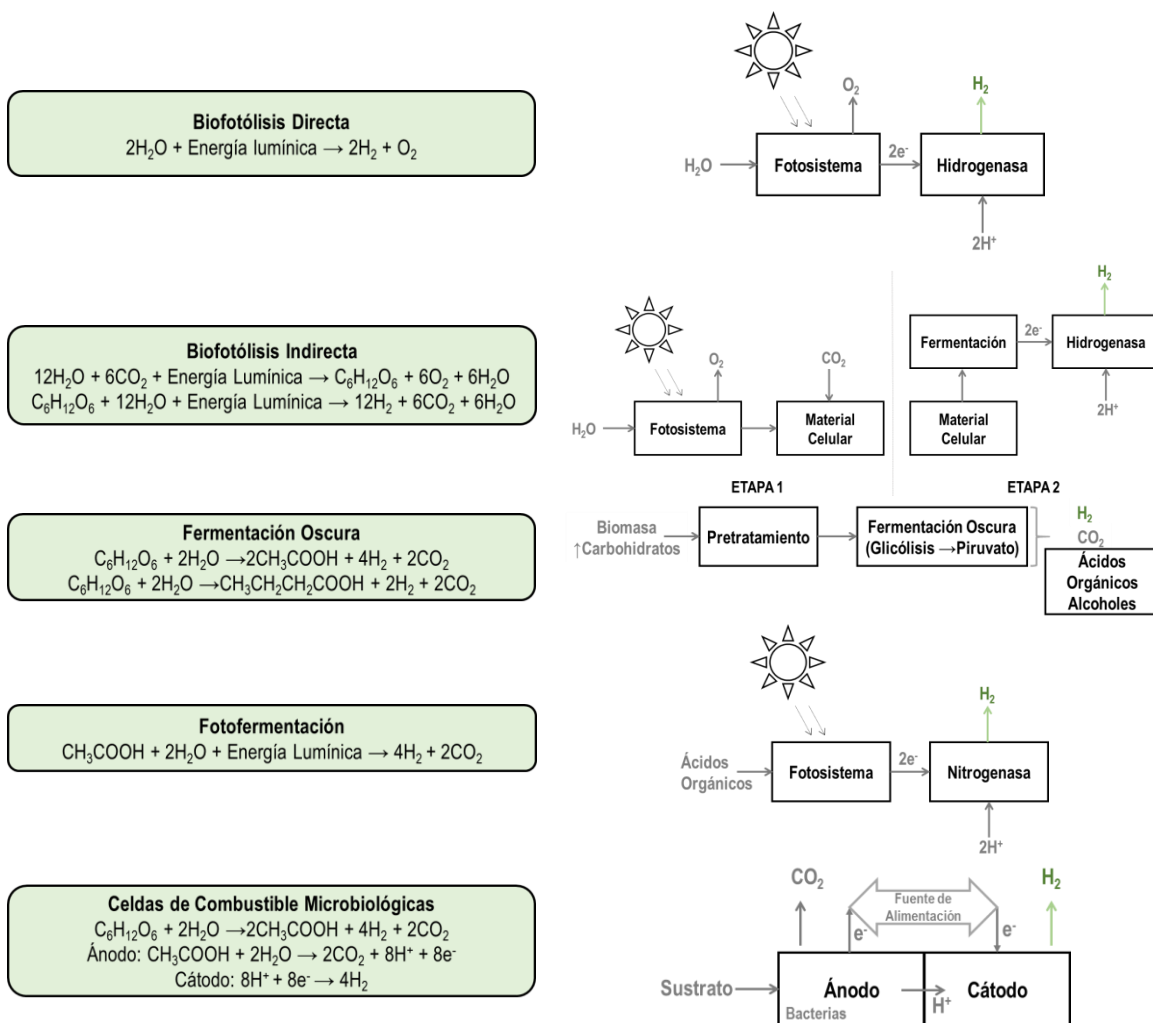


Figura 3. Procesos biológicos para la producción de H₂

Fuente: Hallenbeck & Ghosh (2009); Bičáková & Straka (2012); Ghimire et al. (2015); Nikolaidis & Poullikkas (2017)

En cuanto a los usos del H₂, la Agencia Internacional de la Energía-AIE (2015) indica que a la fecha, este gas no era utilizado en gran medida para ser convertido en electricidad, energía mecánica o térmica sino que estaba siendo utilizado casi por completo como insumo en la industria de refinación y química, también para aplicaciones en el sector metalúrgico, producción de metanol, procesamiento de alimentos y el sector electrónico. El uso del H₂ como portador de energía es emergente, aunque las primeras celdas de combustible se desarrollaron en la década del 60, solo en los últimos diez años se ha desarrollado la tecnología en la medida de la demanda de la industria automotriz. Como un “gas industrial”, el H₂ ya es un sólido negocio global sobre el cual se espera una valoración de \$154,74 mil millones de dólares en 2022 (AIE, 2017a).

3.3 Digestión Anaerobia

La DA puede aplicarse para la transformación de una amplia gama de sustratos, que incluyen agua residual doméstica e industrial, residuos de la industria agrícola y de alimentos y residuos sólidos municipales (Kiyasudeen S, Ibrahim, Quaik, & Ahmed Ismail, 2016). En la aplicación técnica de la DA, la mayor parte de la materia orgánica biodegradable presente en el sustrato se convierte en biogás (aproximadamente 70 a 90%);

solo una pequeña fracción del material orgánico se convierte en material celular como lodo de exceso (entre 5 y 15%); además de la pequeña cantidad producida comparada con la aplicación de sistemas aerobios, el lodo de exceso tiene mayor concentración, mejores características de deshidratación y puede considerarse como un lodo estabilizado. El material que no es convertido en biogás o en lodo de exceso, sale del sistema o reactor como material no degradado (10 a 30%) (von Sperling & Chernicharo, 2005).

El tratamiento de residuos líquidos y sólidos de origen doméstico e industrial a través de la DA ha tenido gran aceptación a nivel mundial, ya que además de las ventajas que ofrece ampliamente reconocidas como el bajo costo de implementación y operación y la baja producción de lodo, permite la recuperación y utilización de los subproductos generados (Foresti et al., 2006; Sawatdeenarunat et al., 2016; Stazi & Tomei, 2018). La DA está consolidada para el tratamiento del agua residual doméstica, de una gran variedad de efluentes líquidos generados en la actividad agroindustrial, en la transformación de la fracción orgánica susceptible de biodegradación de los residuos sólidos urbanos y de la industria agrícola y de alimentos y, en la estabilización de lodo primario y secundario generados en las plantas de tratamiento de agua residual.

La DA puede ser considerada como un ecosistema (von Sperling & Chernicharo, 2005) que involucra un proceso biológico complejo, no lineal y dinámico (Hu et al., 2018), en el cual un consorcio de diferentes tipos de microorganismos mutuamente dependientes, con diferentes condiciones de operación y rutas metabólicas específicas (Campos, 1999; Fagbohunge et al., 2017; Siddique & Wahid, 2018), trabajan entre sí en la conversión de compuestos orgánicos complejos como carbohidratos, proteínas y lípidos a productos finales más simples como metano (CH_4) principalmente y en menor proporción dióxido de carbono (CO_2) y trazas de sulfuro de hidrógeno (H_2S), gas amonio (NH_3), Nitrógeno e hidrógeno (H_2) y agua, además de nuevo material celular (Biosólido), bajo estrictas condiciones anaerobias (Potencial de Oxidación reducción $-\text{ORP} \leq 200\text{mV}$) (Appels, Baeyens, Degreuve, & Dewil, 2008; Bong et al., 2018; Goux et al., 2016; Surendra et al., 2014; Uçkun Kiran et al., 2016).

Aunque en la DA intervienen o interactúan por lo menos once grupos de microorganismos (Alvarado et al., 2014) de manera general, puede considerarse que comprende cuatro etapas definidas: Hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Gujer y Zehnder, 1983 citado por Lucas, Santos, Raphaele, Chaves, & Van Haandel, 2018). La **Figura 4** muestra gráficamente las interacciones metabólicas y microorganismos involucrados en la DA, en sus etapas de hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

Hidrólisis: La hidrólisis se puede definir como un proceso en el cual los sustratos poliméricos complejos, disueltos o particulados, son transformados en compuestos monoméricos o diméricos que pueden ser fácilmente consumidos por las bacterias acidogénicas. En el proceso, las partículas poliméricas son degradadas a través de la acción de exo-enzimas para generar moléculas de menor tamaño, las cuales pueden cruzar la barrera celular. (Henze et al., 2008). Durante la hidrólisis, las proteínas son degradadas a través de (poli) péptidos para formar aminoácidos, mientras que los carbohidratos se transforman en azúcares solubles (mono y disacáridos) y los lípidos son convertidos en ácidos grasos de cadena larga-AGCL (C15 a C17) y glicerina (Campos, 1999).

La hidrólisis es muy sensible a la temperatura y sus fluctuaciones, además es la etapa limitante para la velocidad de degradación especialmente con sustratos sólidos y/o semi-sólidos y con tipos de agua residual de alta relación sólidos suspendidos totales-SST/DQO (Henze et al., 2008; Yuan & Zhu, 2016).

Acidogénesis: Los compuestos solubles, resultantes del proceso de hidrólisis, son absorbidos en las células de las bacterias fermentativas y luego excretadas como compuestos orgánicos simples, entre los que se encuentran los ácidos grasos volátiles de cadena corta -AGV's-, alcoholes, ácido láctico y compuestos minerales como CO_2 , H_2 , NH_3 y H_2S (Campos, 1999). La acidogénesis es un proceso metabólico de

fermentación, en el cual los compuestos orgánicos son utilizados tanto como donadores de electrones como aceptores de los mismos (Megonigal et al., 2003).

La mayoría de las bacterias acidogénicas son anaerobias estrictas y cerca del 1% son bacterias facultativas que pueden utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones en sus actividades metabólicas, aspecto importante en la DA, ya que de esta manera, las bacterias anaerobias estrictas como las arqueas metanogénicas son protegidas por la eventual presencia de oxígeno en el medio (Henze et al., 2008; Ziemiński, 2012).

La acidogénesis es realizada por un grupo grande y diverso de bacterias como las especies del género *Clostridium* y *Bacteroids*. Las primeras constituyen bacterias que forma esporas, permitiendo su supervivencia frente a condiciones ambientales adversas; las segundas son organismos que se encuentran comúnmente en el tracto digestivo y participan en la degradación de azúcares y aminoácidos (von Sperling & Chernicharo, 2005). La acidogénesis es referida como la etapa en la cual predomina la producción de H_2 (Khan et al., 2018; Penniston & Gueguim Kana, 2018), y en el contexto de los estudios y aplicaciones específicas para la producción de este biogás, se denomina Fermentación Oscura.

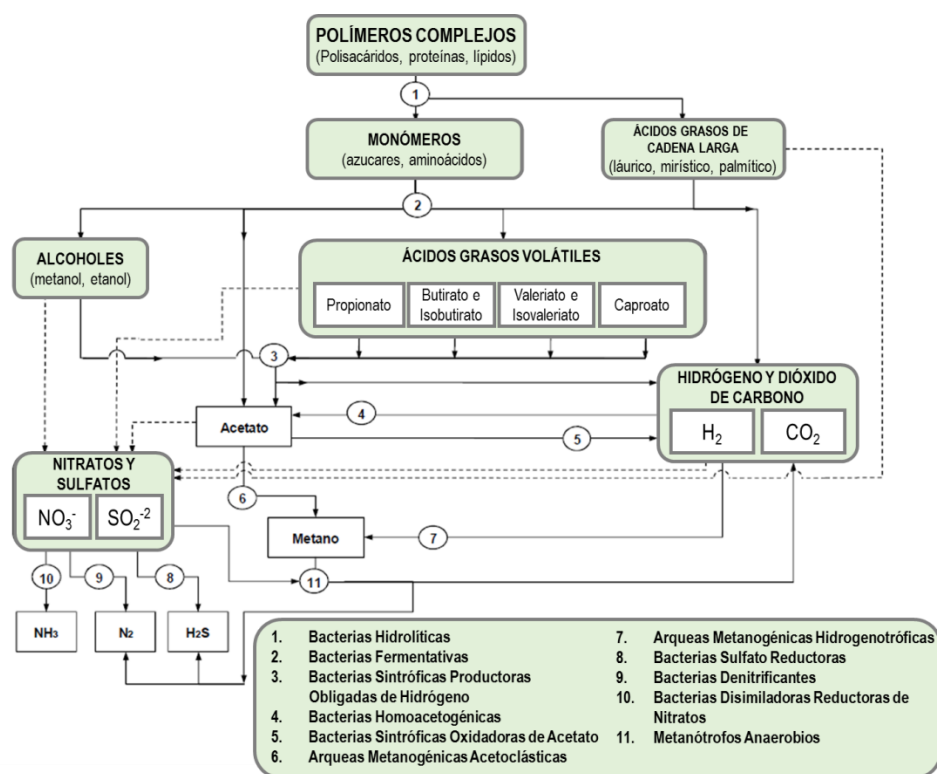


Figura 4. Interacciones metabólicas y microorganismos involucrados en la DA
Fuente: Alvarado et al. (2014)

Acetogénesis: Los AGV's diferentes al acetato, que son producidos durante la etapa de acidogénesis, son convertidos posteriormente a acetato, H_2 y dióxido de carbono por las bacterias acetogénicas. Los principales sustratos acetogénicos son el propionato y butirato, los cuales son intermediarios importantes en la DA; el lactato, etanol, metanol e inclusive el H_2 y CO_2 , también son convertidos homoacetogénicamente a acetato (Henze et al., 2008). Autores como Megonigal et al. (2003) indican que la etapa de acetogénesis relacionada con la conversión de los AGVs a acetato, es decir sin considerar la homoacetogénesis, puede considerarse como una fermentación secundaria (la fermentación primaria correspondería a la etapa de acidogénesis).

Desde la perspectiva termodinámica y electroquímica, la acetogénesis es enteramente no espontánea y endotérmica ($\Delta H > 0$, $\Delta S < 0$ and $\Delta G^\circ > 0$) (Oh et al., 2018). La oxidación de los AGVs como el ácido butírico y propiónico sólo estará favorecida a bajas presiones parciales de H_2 , escenario que es facilitado por la interrelación entre las bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno-OHPA, y las arqueas metanogénicas consumidoras de hidrógeno. Este último grupo, consume el H_2 generado por las OHPA manteniendo una presión parcial de H_2 a un nivel adecuado para que termodinámicamente pueda darse la conversión de los AGV's a acetato e H_2 . Esta asociación se conoce como "Relación sintrófica" o "transferencia interespecífica de hidrógeno" (Díaz-Baez, Espitia Vargas, & Molina Perez, 2002; Megonigal et al., 2003).

Los cálculos asociados con las reacciones acetogénicas permiten determinar que sólo son termodinámicamente favorables (es decir, ocurren en el sentido de la formación de acetato) cuando la presión parcial de H_2 en el medio es muy baja (10^{-4} atm para la conversión de propionato y 10^{-3} atm para butirato). Por lo tanto, una vez formados los ácidos propiónico y butírico como productos intermediarios, la conversión en acetato sólo será posible mediante la existencia de poblaciones capaces de remover el H_2 , de forma rápida y eficiente (Campos, 1999). Las arqueas metanogénicas consumidoras de H_2 lo utilizan tan rápidamente, que la presión parcial de este gas cae por debajo de 10^{-4} atm, lo cual es suficiente para asegurar que se lleve a cabo la reacción acetogénica (Díaz-Baez et al., 2002; Henze et al., 2008; Müller et al., 2010). Las bacterias acidogénicas también se benefician de la relación sintrófica en referencia, ya que el mantenimiento de bajas presiones parciales de H_2 favorece la producción de H_2 y productos finales más oxidados como el acetato y el CO_2 , siendo más eficiente y conduciendo a una síntesis adicional de ATP (Megonigal et al., 2003).

De acuerdo con lo reportado por Zhou et al. (2017), es necesario tener en cuenta que las "Bacterias homoacetogénicas", las cuales son anaerobias estrictas, pueden realizar su metabolismo de forma autótrofa (H_2 y CO_2/CO) y/o heterótrofa (compuestos orgánicos tales como sacáridos, alcoholes, compuestos aromáticos) la producción de acetato. De otro lado, las bacterias sintróficas oxidadoras de acetato, son un grupo de microorganismos que tienen la capacidad de oxidar el acetato produciendo H_2 y CO_2 . La oxidación de acetato a H_2 y CO_2 requiere que la presión parcial de H_2 sea inferior a 10^{-5} atm y su reacción tiene una ΔG° (kJ/mol)= 104,6 por lo cual no es favorable bajo condiciones estándar, siendo entonces termodinámicamente favorable bajo la colaboración sintrófica de las arqueas metanogénicas consumidoras de H_2 (Fotidis et al., 2013; Solera del Río, 2014).

Metanogénesis: Es la fase final de la DA, considerada la etapa más lenta y consiste en la producción de CH_4 por parte de las arqueas metanogénicas; sin estos microorganismos, no se llevaría a cabo la descomposición completa de la materia orgánica debido a la acumulación de los productos finales de las bacterias acidogénicas (Mara & Horan, 2003). Las arqueas metanogénicas son anaerobias estrictas, por lo cual, la presencia de oxígeno molecular es letal para ellas, así mismo, estos microorganismos son particularmente sensibles a los cambios de temperatura y pH, y su desarrollo es inhibido a altos niveles de AGV's y de otros compuestos, como el H_2 , amoníaco y H_2S (Zeikus, 1977 citado por Ziemiński, 2012).

Las arqueas metanogénicas metabolizan una variedad de compuestos orgánicos (acetato, formiato, metanol, metilaminas e incluso carbonatos), pero se dividen en solo dos grupos metabólicos basados en un sustrato específico, el Hidrógeno molecular: Arqueas Metanogénicas Acetoclásticas-AMA utilizan el acetato y, Arqueas Metanogénicas Hidrogenotróficas-AMH utilizan el Hidrógeno y el CO_2 (Henze et al., 2008; Oh et al., 2018). Las AMH tienen una velocidad de crecimiento mucho mayor que la correspondiente a las AMA, de modo que estas últimas limitan la velocidad de transformación de material orgánico complejo (von Sperling & Chernicharo, 2005). Las AMH comúnmente identificadas en la DA son las del género *Methanobacterium*, *Methanothermobacter* y *Methanospirillum* (Castellano-Hinojosa et al., 2018).

3.4 Producción de H₂ a través de la etapa fermentativa de la DA o fermentación oscura-FO

La acidogénesis en la DA es referida como la etapa en la cual predomina la producción de H₂ (Khan et al., 2018; Penniston & Kana, 2018), y en el contexto de los estudios y aplicaciones específicas para la producción de este biogás, se denomina FO. Manzini et al. (2015) indican que la FO como tal, involucra no solo la fase fermentativa o acidogénica, sino que se debe reconocer la fase precedente de hidrólisis. Autores como Zahedi et al. (2016) bajo el contexto de la producción biológica de H₂ y CH₄ en fases separadas, indican que *“un sistema de fases separadas normalmente se compone de una etapa de hidrólisis-acidogénesis realizada en la primera fase (fermentación oscura) y una etapa de acetogénesis-metanogénesis realizada en la segunda fase”*. En todo caso, tal como lo expresan Mohan et al., (2007) para aprovechar el H₂ como producto final del proceso de DA en lugar de metano, son requisitos previos importantes, la inhibición de la reacción bioquímica específica es decir la metanogénesis y, la optimización de la reacción bioquímica específica de fermentación/acidogénesis.

La fermentación es un proceso redox bajo condiciones anaerobias, en el que la oxidación del sustrato es parcial y el aceptor final de electrones es una molécula orgánica, generalmente el mismo sustrato o un intermedio de la oxidación del sustrato. Los electrones derivados de este proceso se utilizan para la reducción de protones a H₂ molecular, con el fin de equilibrar el potencial redox celular (Schwartz, 2013; Cabrol et al., 2017). Para estimar los rendimientos teóricos de producción de H₂ a través de la FO, la reacción de biotransformación de la glucosa es ampliamente aceptada como referencia, especialmente por su alta biodegradabilidad y la clara comprensión de las vías de degradación (Hay et al., 2013; Tapia-Venegas et al., 2015; Łukajtis et al., 2018).

La cantidad estequiométrica, teóricamente máxima, de H₂ por mol de glucosa, es de 12 moles, según la **Ecuación 1**, sin embargo, la oxidación completa de la glucosa en H₂ y CO₂ es limitada, ya que es termodinámicamente desfavorable, ΔG° (kJ/mol) = + 3,2, además, no hay disponibilidad de energía metabólica al efectuarse esta reacción (Lens et al., 2005; Sinha & Pandey, 2011). Así, en todos los procesos de fermentación factibles termodinámicamente desarrollado por microorganismos conocidos, el H₂ se produce solo en combinación con AGVs y/o alcoholes, no como el único compuesto reducido; por lo tanto, el rendimiento teórico máximo de 12 mol H₂ / mol de glucosa de la conversión completa de glucosa a H₂ y CO₂ nunca se alcanza en ningún sistema biológico *in vivo* conocido (Westermann et al., 2007; Cabrol et al., 2017).



La formación de hidrógeno molecular a través de la FO generalmente sigue dos rutas en presencia de coenzimas específicas, ya sea a través de la de la vía de Piruvato-Formiato-Liasa-PFL o la piruvato:ferredoxina oxidoreductasa-PFOR (ver **Figura 5**); en ambos casos, la glucosa se convierte primero en piruvato (Nandi & Sengupta, 1998; Cai et al., 2011; Kontur et al., 2012; Cabrol et al., 2017). Así, inicialmente, la glucosa se degrada por la acción del ion Dinucleótido de Nicotinamida-NAD⁺ en piruvato, H⁺ y NADH mediante glicolisis como se expresa en la **Ecuación 2**.



En la vía PFL, la degradación del piruvato por la acción de la coenzima A (CoA-H) produce acetil-CoA y formiato (Das & Veziroğlu, 2001; Bundhoo & Mohee, 2016) como se expresa en la **Ecuación 3**.



El formiato se divide en H₂ y CO₂ (Ver **Ecuación 4**) mediante catálisis a través de un complejo Formiato-Hidrógeno-Liasa-FHL, el cual contiene una hidrogenasa. De acuerdo con Tapia-Venegas et al. (2015) y Cabrol et al. (2017), esta vía es utilizada por bacterias facultativas, como las Enterobacterias y dependiendo del tipo de microorganismo, puede ocurrir a través de [NiFe] hidrogenasa (Ech hidrogenasa) o formiato-dependiente

hidrogenasa [FeFe]. Teniendo en cuenta que en la glicólisis se producen 2 moles de piruvato (**Ecuación 2**) y que a partir de éste (vía PFL) se producen 2 moléculas de formiato, los microorganismos facultativos tienen un rendimiento teórico máximo de producción de H₂, de 2 moles por mol de glucosa (Cai et al., 2011; Sinha & Pandey, 2011; Bundhoo & Mohee, 2016).

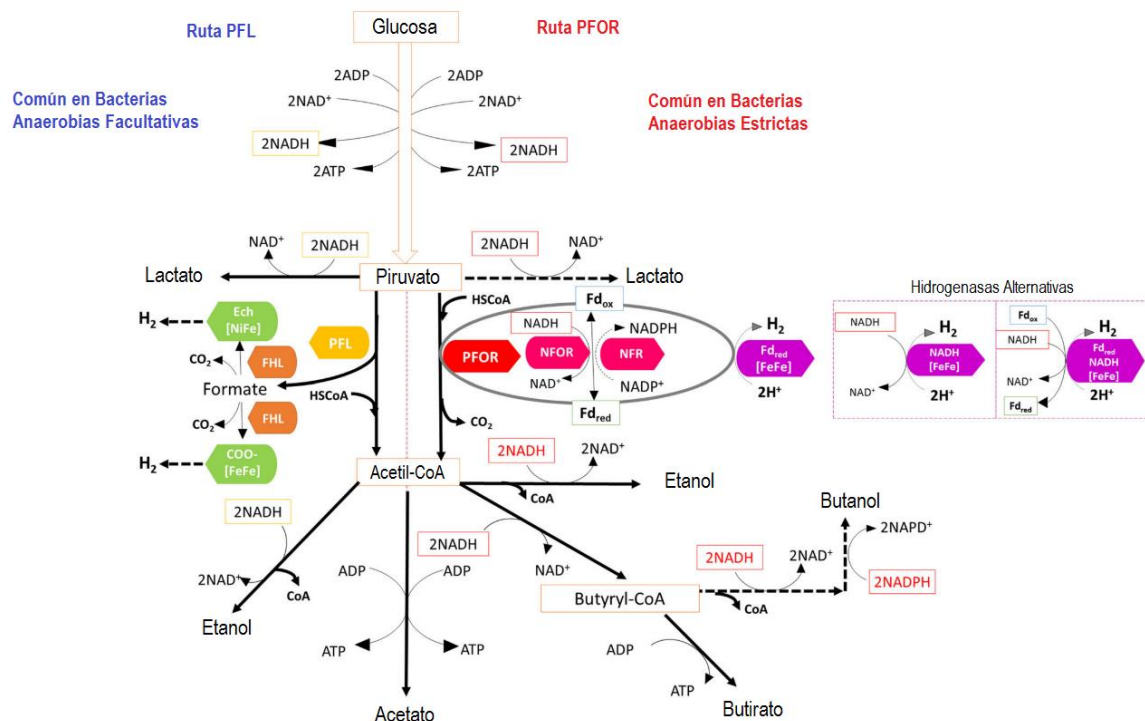
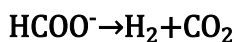


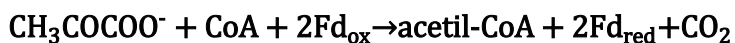
Figura 5. Principales rutas metabólicas en la FO

Fuente: Adaptado de (Cabrol et al., 2017)

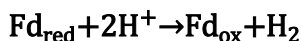


Ecuación 4

De otro lado, en la vía PFOR, el piruvato es oxidado por CoA y ferredoxina oxidasa [Fdox] a acetil-CoA, ferredoxina reductasa [Fdred] y CO₂. La [Fdred] luego reduce los iones H⁺ a H₂ y se oxida a [Fdox] (Hallenbeck & Benemann, 2002; Bundhoo & Mohee, 2016), como se expresa en la **Ecuación 5** y la **Ecuación 6**. Hasta este punto, en la vía PFOR a partir de la oxidación del piruvato, se pueden obtener máximo dos moles de H₂ por mol de glucosa metabolizada (Sinha & Pandey, 2011).



Ecuación 5



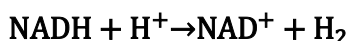
Ecuación 6

Dónde:

Fd_{red}: Ferredoxina reductasa; **Fd_{ox}**: Ferredoxina oxidasa; **CoA**: Coenzima A

Sin embargo, en la vía PFOR, otras dos moles de H₂ pueden ser producidas: La vía PFOR es utilizada principalmente por microorganismos anaerobios estrictos, como las del género Clostridium, los cuales bajo determinadas condiciones, pueden reoxidar directamente el NADH generado durante la glucólisis para producir moléculas de hidrógeno adicionales a través de otras dos hidrogenasas, como las NADH dependientes -NADH

- [FeFe]- y NADH-F_dred bifurcada dependientes -NADH-F_dred- [FeFe]- (Tapia-Venegas et al., 2015; Cabrol et al., 2017), reacción que se puede expresar mediante la **Ecuación 7**.



Ecuación 7

Conforme a la reacción representada en la **Ecuación 7**, si todo el NADH es reoxidado, se podría obtener un total de 4 moléculas de H₂ (Teniendo en cuenta que en la glicolisis se producen 2 moles de NADH) a partir de la fermentación de una molécula de glucosa. Los microorganismos que solo tienen la vía PFL no pueden acceder al NADH para la producción de hidrógeno y por lo tanto, en teoría, la producción de este biogás está limitada a 2 mol de hidrógeno por mol de glucosa (Cabrol et al., 2017).

No obstante, de acuerdo con lo compilado por Bundhoo & Mohee (2016), la formación adicional de H₂ a partir de la reoxidación del NADH, entre otros aspectos, depende del producto final, por ejemplo si es ácido butírico, no habrá NADH residual disponible para la conversión en H₂ y en ese sentido, es posible producir únicamente 2 mol de H₂ (**Ecuación 8**) mientras que es posible sintetizar un máximo de 4mol de H₂ por mol de glucosa con ácido acético como producto final (**Ecuación 9**). Cuando los alcoholes son los productos finales, se obtiene un menor rendimiento de hidrógeno, ya que los alcoholes contienen átomos de hidrógeno adicionales que no se pueden convertir en H₂ (Vardar-Schara et al., 2008), en los cuales para el caso de etanol el balance de producción de H₂ es cero (**Ecuación 10**), situación que también se presenta cuando el producto final es ácido láctico (**Ecuación 11**); de otro lado, cuando el producto final es ácido propiónico (**Ecuación 12**), se consumen dos moles de H₂ (Antonopoulou et al., 2007).



Ecuación 8



Ecuación 9



Ecuación 10



Ecuación 11



Ecuación 12

Además de las anteriores consideraciones, el rendimiento en la producción de H₂ puede diferir a la esperada estequiométricamente cuando se utilizan cultivos mixtos por ejemplo, debido entre otras razones a: i) el sustrato, por ejemplo la glucosa, puede ser degradado mediante otras rutas metabólicas sin la producción de hidrógeno por la acción de bacterias tales como homoacetogénicas, sulfatoredutoras, reductoras de nitrato y arqueas metanogénicas; ii) una fracción del sustrato es utilizado por los microorganismos para su reproducción celular y, iii) limitaciones termodinámicas en la reoxidación del NADH, lo cual implica entre otros aspectos, una baja presión parcial de este biogás (Angenent et al., 2004; Li & Fang, 2007; Łukajtis et al., 2018).

Existen otros aspectos que afectan negativamente la producción biológica de H₂ en la FO, como la presencia en concentraciones excesivas de iones metálicos, derivados de furano y compuestos fenólicos, altas concentraciones de nitrógeno en la forma NH₃ y NH₄⁺ y, metabolitos del proceso como los AGVs (Bundhoo & Mohee, 2016). Así mismo, otros factores importantes que afectan el desempeño de la FO y por consiguiente, las tasas máximas de producción y rendimientos esperados, están relacionados con condiciones operacionales y ambientales tales como pH, tiempo de retención hidráulico, nutrientes, temperatura, concentración del sustrato, inóculo y tipo de sustrato (Blanco et al., 2012).

3.4.1 Inóculo

En el contexto de la DA, el inóculo puede ser definido como una población de microorganismos de arranque o “starter” extraídos de un stock o cultivo madre (Das et al., 2017), activos (Gu et al., 2014) y capaces de interactuar entre si y adaptarse a diversas condiciones ambientales, en un sistema y/o reactor para la producción de biogás (Wojcieszak et al., 2017) u otros objetivos específicos tales como la disminución de los periodos de arranque en dicho sistema, aumentar las tasas de degradación del sustrato y garantizar la estabilidad del proceso (Torres et al., 2007; Quintero et al., 2012; Gu et al., 2014). Así, las anteriores consideraciones respecto al inóculo, también son aplicables en el contexto de la producción de H_2 a través de la FO, la cual puede llevarse a cabo a través de cultivos de microorganismos puros o mixtos.

El uso de cultivos mixtos de microorganismos presenta ventajas sobre el uso de cultivos puros, porque ofrecen menores costos operacionales, no requieren condiciones estrictas de esterilidad en el proceso, posibilita el control operacional de acuerdo con la cinética de diferentes grupos microbiológicos y, permiten el uso de residuos líquidos como sustrato (Valdez-Vazquez et al., 2005; Chen et al., 2017). Adicionalmente, existe una gran variedad de fuentes con diversidad microbiológica que pueden ser utilizadas como inóculo tales como suelo, estiércol, compost, sedimento y lodos de digestores anaerobios y de plantas de tratamiento de agua residual (Baghchehsaraee et al., 2008; Chang et al., 2011; Ghimire et al., 2015).

La principal desventaja del uso de cultivos mixtos para la producción de H_2 está relacionada con la presencia de microorganismos que lo consumen (De Sá et al., 2013), ya que en un sistema con una comunidad diversa de microorganismos, existe una coexistencia de bacterias productoras de hidrógeno facultativas como las del género *Enterobacter*, *Bacillus* y *Escherichia* o anaerobias estrictas como las del género *Clostridium* y, de microorganismos consumidores de H_2 de diversos géneros, principalmente arqueas metanogénicas y bacterias homoacetogénicas así como bacterias sulfatoreductoras, productoras de ácido propiónico y reductoras de nitrato (ver **Tabla 2**) (Li & Fang, 2007; Chang et al., 2011; Bundhoo et al., 2015). Una de las estrategias para lograr que durante la FO el H_2 no sea consumido por otros microorganismos, es el tratamiento previo del inóculo o lodo semilla, para suprimir las bacterias consumidoras de este biogás y que predominen aquellas bacterias que lo producen (Li & Fang, 2007; Braguglia et al., 2018).

Las diferencias fisiológicas entre los microorganismos productores de H_2 y los microorganismos que lo consumen son la base del razonamiento científico detrás del desarrollo de los diversos métodos propuestos para su pretratamiento; por ejemplo, especies del genero *Clostridium* puede formar esporas protectoras cuando se encuentran en un ambiente restrictivo como altas magnitudes de temperatura, acidez extrema y alcalinidad, pero las arqueas metanogénicas no tienen tal capacidad (Zhu & Béland, 2006; Ruggeri et al., 2015).

Tabla 2. Microorganismos y su rol en los procesos de fermentación

Microorganismo	Ejemplos	Características	Rol en los procesos de fermentación
<i>Clostridium</i> spp.	<i>Clostridium butyricum</i> <i>Clostridium pasteurianum</i> <i>Clostridium beijerinckii</i> <i>Clostridium tyrobutyricum</i> <i>Clostridium sartagoforme</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>Clostridium saccharolyticum</i>	Bacterias Anaerobias estrictas, mesofílicas, formadoras de esporas. Las BPH más populares.	Capaces de fermentar un amplio rango de carbohidratos. Condiciones de operación entre 30 -43°C, pH 5,0 – 8,5 Unidades.
<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	Bacterias anaerobias facultativas, mesofílicas.	Tienen mayor tolerancia al estrés oxidativo - proporciona un ambiente anaeróbico, algunos son acidúricos, las condiciones de fermentación varían de 30 a 40 ° C, pH de 4,0 a 7,5.

Microorganismo	Ejemplos	Características	Rol en los procesos de fermentación
Bacillus spp.	<i>Bacillus firmus</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus megaterium</i> etc.	Bacterias anaerobias facultativas, mesofílicas.	Suministra un ambiente anaerobio. Pueden tener características importantes como la tolerancia a condiciones de salinas. Sus condiciones de fermentación varían de 35 a 40 °C, pH 5,3 – 7,4 Unidades.
Klebsiella spp.	<i>Klebsiella pneumonia</i>	Bacterias anaerobias facultativas	Tienen mayor tolerancia al estrés oxidativo. Pueden producir H ₂ a valores inferiores a 4,0. Son consideradas bacterias termofílicas.
Otras bacterias mesofílicas	<i>Megasphaera elsdenii</i> <i>Ethanoligenens harbinensis</i> <i>Caloranaerobacter azorensis</i> etc.	Bacterias anaerobias estrictas o facultativas	Producen H ₂ a partir de diferentes tipos de carbohidratos. No han sido ampliamente estudiadas.
Bacterias termofílicas	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Caloranaerobacter azorensis</i>	Bacterias anaerobias estrictas o facultativas	Tienen altas tasa de producción y rendimiento de hidrógeno, las condiciones de fermentación varían de 40 – 60°C, pH 6,2 – 8,0 Unidades.
Bacterias psicrófilas	<i>Rahnella aquatilis</i> etc.	Bacterias anaerobias estrictas o facultativas	Bajo costo en operación ----Temperatura ambiente-, las condiciones de fermentación varían de 20 a 25°C, pH 6,5 Unidades.
Metanogénicas	<i>Methanobacterium</i> spp. <i>Methanococcus</i> spp	Anaerobias estrictas, mesofílicas. Activas en un rango de pH estrecho.	Consumen H ₂ para la producción de metano.
Bacterias Homoacetogénicas	<i>Clostridium carboxidivorans</i> <i>Clostridium ragsdalei</i> <i>Clostridium ljungdahlii</i>	Anaerobias estrictas. Formadoras de esporas.	Utilizan el H ₂ como donador de electrones para la generación de ácidos grasos volátiles, reducción de ácidos carboxílicos en sus correspondientes alcoholes.
Otros microorganismos	<i>Enterococcus</i> spp. <i>Thermoanaerobacterium</i> spp.	Bacterias anaerobias estrictas o facultativas	Compiten por el sustrato con BPH. Pueden degradar hidratos de carbono complejos (celulosa, almidón, etc.) a compuestos orgánicos simples.

Fuente: Wong et al. (2014); Wang & Yin (2017); Estevam et al. (2018)

Los métodos o “pretratamientos” se pueden clasificar de manera general en dos grupos principales: los de tipo químico y los de tipo físico (Wong et al., 2014). Entre los primeros se encuentran el pretratamiento ácido, básico, cloroformo, sodio 2 - bromoetanosulfonato (BES por sus siglas en inglés), CO₂ e iodopopano; mientras que el segundo grupo está comprendido por el térmico, diferentes tipos de irradiación (microondas, ultrasonido, rayos gama e infrarrojo), aireación y congelamiento/descongelamiento (Zhu & Béland, 2006; Chang et al., 2011; Wong et al., 2014; Rafieenia et al., 2018).

Diferentes estudios comparativos han demostrado mejores rendimientos en la producción de H₂ mediante el pretratamiento térmico (Dong, Zhenhong, Yongming, & Longlong, 2010; Kan, 2013; Mohammadi, Ibrahim, Mohamad Annuar, & Law, 2011; Mu, Yu, & Wang, 2007; S. E. Oh, Van Ginkel, & Logan, 2003; J. Wang & Wan, 2008; K. Zhang, Ren, Guo, Wang, & Cao, 2011), mientras otros demuestran mayores rendimientos en la aplicación del pretratamiento ácido (Chang et al., 2011; Cheong & Hansen, 2006), diferentes tipos de irradiación (Song et al., 2012; Yin, Hu, & Wang, 2014), aireación (Ren et al., 2008), cloroformo (B. Hu & Chen, 2007) y BES (Venkata Mohan, Lalit Babu, & Sarma, 2008). La **Tabla 3** muestra los rendimientos de producción de H₂ en diferentes estudios aplicando pretratamiento térmico del inóculo.

Tabla 3. Rendimientos de producción de H_2 en diferentes estudios aplicando pretratamiento térmico

Inóculo	Sustrato	Rendimiento de H_2	Magnitudes T y t	Fuente
LA Biodigestor - AR Municipal	Glucosa	1,78mol H_2 /molGlucosa	100°C-15min	(J. Wang & Wan, 2008a)
Suelo-Cultivo de tomate	Glucosa	0,92mol H_2 /molGlucosa	104°C-120min	(Logan, Oh, Kim, & Van Ginkel, 2002)
LA Biodigestor – AR Municipal	Sucrosa	2,6mol H_2 /molSucrosa (Primera alimentación)	Punto de ebullición del inóculo -20min	(Zhu & Béland, 2006)
LA Reactor UASB – AR procesamiento de Soya.	Glucosa	2,0mol H_2 /molGlucosa (Primera alimentación)	102°C-90min	(Mu et al., 2007)
LA Biodigestor – AR Municipal	Glucosa	0,9mol H_2 /molGlucosa	100°C-15min	(Kan, 2013)
Lodo Activado- AR Municipal	Mezcla de azúcares (Xilosa, Glucosa, arabinosa y otros)	5.03mmol/gAzucar	100°C-60min	(K. Zhang et al., 2011)

La selección del método o pretratamiento para la inhibición de los microorganismos consumidores de hidrógeno depende del origen y características del inóculo, de las características del sustrato, de los costos de inversión y operación, factibilidad técnica y complejidad, afinidad con los microorganismos productores de hidrógeno y de la compatibilidad con el metabolismo de estos últimos, entre otros aspectos (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009).

De igual forma, la efectividad de los métodos de pretratamiento del inóculo dependen de sus características y de las condiciones específicas en las que se lleve a cabo, por lo cual se han identificado ventajas, desventajas y resultados controversiales en la aplicación de cada uno de ellos (Dessi et al., 2018; G. Kumar, Zhen, et al., 2016; L. Singh & Wahid, 2015). En ese sentido, podría considerarse que no existe el pretratamiento “perfecto” del inóculo (Bundhoo et al., 2015), por lo que la optimización de los métodos de pretratamiento de inóculos mixtos constituyen una necesidad en pro de alcanzar mayores rendimientos en la producción de hidrógeno a través de la FO y a su vez, un desafío para su aplicación en un escenario de gran escala (Baghchehsaraee et al., 2008; Chang et al., 2011; Singh & Wahid, 2015). No obstante, varios autores coinciden en que el pretratamiento térmico es el método más utilizado y simple para favorecer el predominio de microorganismos productores de hidrógeno en un inóculo mixto (De Sá et al., 2011; Rafieenia et al., 2018; Ren et al., 2008).

3.4.1.1 Pretratamiento térmico

La temperatura es un factor vital que afecta la supervivencia de los microorganismos; en el contexto de la producción de H_2 a través de la FO. Autores como Wang & Yin (2017) y Dessi et al. (2018) haciendo alusión a lo expuesto por Appels et al. (2008), indican que la exposición a magnitudes elevadas de temperatura por parte de los microorganismos que no tienen la capacidad de formar esporas, provoca la alteración de su pared celular y membrana, lisis celular y desnaturalización de las proteínas. Lo anterior, puede considerarse como la concepción que soporta la aplicación del pretratamiento térmico de un inóculo mixto, para eliminar los microorganismos consumidores de hidrógeno no formadores de esporas como las arqueas metanogénicas y favorecer el predominio de aquellos microorganismos que poseen esta característica, los cuales incluyen diversas especies del género *Clostridium* y *Bacillus* (Solowski et al., 2018; Rafieenia et al., 2018).

No obstante, autores como Oh et al. (2003) anotan que algunos microorganismos consumidores de hidrógeno, como algunas bacterias homoacetogénicas, también son formadores de esporas y en ese aspecto, el pretratamiento térmico puede no ser efectivo para eliminar dicha etapa en la FO y obtener mayores rendimientos en la producción de H_2 . Así mismo, autores como Hu & Chen (2007) anotan que el efecto del pretratamiento

térmico de un inóculo puede ser menor en cuyo caso sea un lodo granular, ya que la estructura física de éste, provee un nicho protector para microorganismos como las arqueas metanogénicas.

De otro lado, autores como Hawkes et al. (2007) y Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo (2009) indican que el pretratamiento térmico también favorece la germinación de las esporas de aquellos microorganismos que adoptan esta característica, a lo que autores como Setlow (2003) definen como un “sub letal” choque térmico que promueve la activación de las mismas. La **Figura 6** representa gráficamente la transición de una espora a célula activa promovida por la aplicación del pretratamiento térmico.

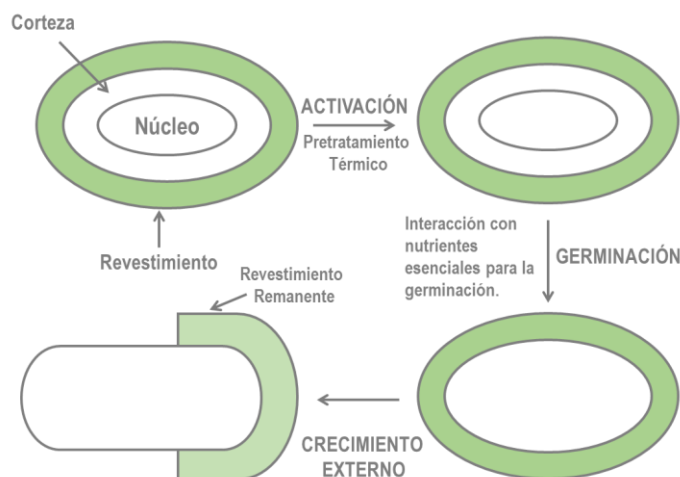


Figura 6. Representación gráfica de la transición de una espora a célula activa

Fuente: Setlow (2003); Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo (2009)

De acuerdo con Wang & Yin (2017) el pretratamiento térmico se ha aplicado en diferentes tipos de inóculo, en los cuales la magnitud de temperatura varía de 65°C a 121°C, y el tiempo de exposición de 10 min a 10 h. Los mismos autores indican que la condición más aplicada ha sido 100°C y 60 min, mientras que autores como Wong et al. (2014) mencionan que menores magnitudes de temperatura como 65°C y tiempos de exposición de 15 min también han sido aplicados ampliamente. Este escenario ya había sido visualizado por autores como Baghchehsaraee et al. (2008) quienes expusieron que el pretratamiento térmico de un inóculo puede ser menos intensivo en términos de su demanda energética, si es efectuado a temperaturas menores a las generalmente utilizadas; y de manera concurrente Wang et al. (2011) anotaron que un aumento en la temperatura no se traduce necesariamente en un mayor rendimiento en la producción de H₂.

Así, la magnitud de temperatura y el tiempo de exposición son dos parámetros cruciales del pretratamiento térmico que constituyen un desafío para lograr una mayor efectividad y en consecuencia, mayores rendimientos en la producción de H₂, tiempos de exposición muy cortos o magnitudes muy bajas de temperatura pueden no ser eficaces para inhibir la mayoría de los microorganismos consumidores de hidrógeno, mientras que tiempos de exposición muy prolongados o magnitudes de temperatura muy altas pueden llevar a la pérdida de la actividad de los microorganismos productores de dicho biogás (Rafieenia et al., 2018; Wong et al., 2014). La **Figura 7** representa gráficamente las relaciones entre la magnitud de temperatura y el tiempo de exposición sobre la efectividad del pretratamiento térmico de un inóculo.



Figura 7. Relaciones entre la magnitud de temperatura y el tiempo de exposición, sobre la efectividad del pretratamiento térmico de un inóculo

Fuente: Wong et al. (2014)

3.4.2 Sustrato

Aunque es posible utilizar diferentes sustancias orgánicas, como carbohidratos, proteínas y lípidos para la producción biológica de H_2 (Ntaikou et al., 2010), la mayoría de estudios relacionados con la producción de este biogás a través de la FO, han utilizado como sustrato monosacáridos (glucosa y la xilosa) y disacáridos (sacarosa y lactosa), debido a su alta biodegradabilidad, de los cuales la glucosa ha sido ampliamente aceptada como la sustancia de referencia para la estimación de los rendimientos de producción teórica (Lopez-Hidalgo et al., 2018; Łukajtis et al., 2018; J. Wang & Wan, 2009). No obstante, una de las desventajas en el uso de carbohidratos puros como la glucosa y sacarosa es que son sustancias con diferentes aplicaciones y usos, como el correspondiente al sector salud y alimenticio y en ese aspecto, existe un escenario de competencia, además su elevado costo (Arimi et al., 2015; Kapdan & Kargi, 2006; Łukajtis et al., 2018).

Las investigaciones están concentrando sus esfuerzos en maximizar el rendimiento en la producción de H_2 utilizando sustratos sostenibles a valores, en lo posible, cercanos a los encontrados cuando se han utilizado sustancias de referencia como la glucosa. Para la producción sostenible de H_2 a través de la FO, el sustrato debe cumplir con ciertos criterios: i) debe estar compuesto principalmente por carbohidratos, ii) debe generarse a partir de fuentes sostenibles, iii) presentar una concentración tal, que haga eficiente el proceso de fermentación y la recuperación de energía sea favorable, iv) requerir un pretratamiento mínimo, y v) ser de bajo costo (F. R. Hawkes, Dinsdale, Hawkes, & Hussy, 2002).

Los residuos agroindustriales cumplen los criterios de sostenibilidad asociados con la producción biológica de H_2 (Corneli et al., 2016; Ghimire et al., 2015; Robledo-Narváez et al., 2013) y en ese sentido, su uso como sustrato en la FO aporta valor agregado (Lopez-Hidalgo et al., 2018). De esta manera, teniendo en cuenta que respecto al sustrato, el uso de materia prima económica y disponible es uno de las principales elementos para una producción eficiente de H_2 a escala real (Arimi et al., 2015), los residuos líquidos con alto contenido de materia orgánica, en este caso carbohidratos, como los generados en el proceso de extracción de almidón de yuca constituyen una potencial alternativa para ser utilizados con ese objetivo (Cappelletti et al., 2011; Madeira et al., 2017; O-Thong et al., 2011). En Colombia, dichos residuos líquidos han sido reconocidos por su alto impacto ambiental y se ha identificado la factibilidad de su tratamiento mediante la DA (Pérez et al., 2009; Torres et al., 2010); así, su uso como sustrato en la producción biológica de H_2 a través de la FO permite contribuir de manera simultánea, a la solución de las problemáticas asociadas con la contaminación ambiental y la producción de energía limpia con mayor poder calorífico (J. Wang & Yin, 2018; Yun et al., 2018).

3.4.2.1 Agua residual agroindustrial del proceso de extracción de almidón de yuca

La yuca, también conocida como tapioca, es un tubérculo rico en carbohidratos y pequeñas cantidades de proteínas, vitaminas y minerales, de gran importancia en la industria alimenticia y agroindustrial a nivel mundial. Más del 70% de su producción la realizan pequeños agricultores en zonas tropicales y subtropicales predominantemente en América Latina, Asia y algunas regiones de África (Okudoh, Trois, Workneh, & Schmidt, 2014; M. Zhang, Xie, Yin, Khanal, & Zhou, 2016).

En Colombia, la agroindustria de extracción de almidón de yuca hace parte importante de la economía, concentrándose su producción en el departamento del Cauca. El proceso emplea raíces frescas de yuca, agua y energía eléctrica como principales recursos, generando residuos sólidos y líquidos cuyo inadecuado aprovechamiento o vertimiento trae impactos ambientales y económicos. Desde el punto de vista industrial y de acuerdo con el tipo de flujo del producto, el proceso de extracción de almidón de yuca puede considerarse como una producción “en línea” o “por producto”, debido a que las operaciones y su distribución están especializadas en la elaboración de un producto definido, como se muestra en la **Figura 8** (Torres et al., 2010).

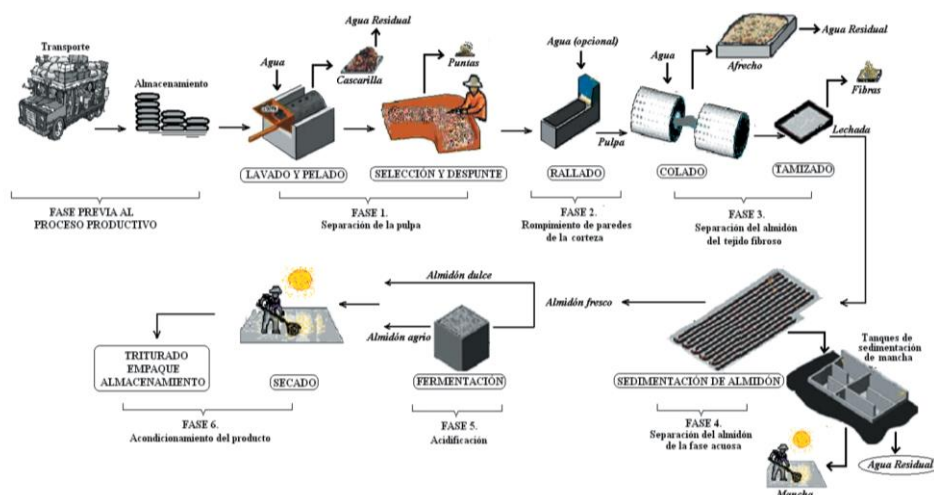


Figura 8. Esquema general del proceso de extracción de almidón de yuca
Fuente: Torres et al. (2010)

Para el contexto regional, del total de agua que ingresa al proceso, el mayor porcentaje se transforma en residuos líquidos generados en las etapas de lavado -pelado, colado y sedimentación, siendo esta última la principal etapa generadora (>80 %) (Torres et al., 2010). Según una compilación realizada por Jurado & Ortiz (2006), durante el proceso, se utilizan de 8 a 9 m³ de agua por tonelada de yuca procesada; considerando que en promedio una rallandería tradicional procesa 4 toneladas de yuca por día y que la yuca en sí tiene un alto contenido de agua, se estima que cada rallandería produce 36 m³ diarios de agua residual. Este efluente se caracteriza por presentar bajos valores de pH, ausencia de alcalinidad bicarbonática, elevada acidez y alto nivel de AGV's, además de un elevado nivel de materia orgánica y carbohidratos fácilmente hidrolizables “ligeros” o con bajas características de sedimentación, lo que hace evidente la necesidad de un tratamiento para reducir la carga contaminante antes de su vertimiento a los cuerpos receptores de la región (Pérez Vidal et al., 2009; Torres Lozada, Marmolejo Rebellón, Cajigas Cerón, & Cerón, 2014; P. Torres et al., 2007).

Las características fisicoquímicas del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca descritas anteriormente y sintetizadas en la **Tabla 4**, la califican como un sustrato potencial para la producción de H₂ a través de la FO (Cappelletti et al., 2011; Madeira et al., 2017).

Tabla 4. Características fisicoquímicas del AR del proceso de extracción de almidón de yuca en diferentes estudios

Autor	Objetivo del estudio	Origen del AR	Características Fisicoquímicas				
			DQO	CARB. ^b	pH	N	P
Tonello, et al. (2018)	Producción de hidrógeno en un reactor anaerobio secuencial de biopelícula.	Brazil 4 industrias de almidón	6270 ± 1506 9623± 5206 4843± 900 6519± 988	4218 ± 1165 5012± 1410 4718± 2332 3048± 800	4,56± 0,24 4,63± 0,52 4,73± 0,71 4,13± 0,32	1,50 ± 0,49 0,912± 0,20 0,67± 0,65 1,23±0,33	-
Khongkhiang et al.(2017)	Producción de hidrógeno a través de fermentación termofílica y electrólisis microbiana.	Tailandia Industria de almidón	21600	16120	5,33	-	-
Torres et al. (2017)	Producción de hidrógeno y desempeño de un reactor anaerobio de lecho fijo.	Brazil Industria de almidón	8152	2119	4,34	212	31
Jijai et al (2015)	Efecto del tamaño de gránulos sobre el desempeño de un reactor UASB.	Tailandia Industria de almidón	18800	-	5,0	320	70
Yela & Peña (2015)	Influencia de la relación sustrato: lodo en la producción biológica de hidrógeno.	Colombia AR Sintética	5754	1328	4,82	40 ^c	34 ^d
Barrios (2015)	Influencia del pH sobre la producción biológica de hidrógeno.	Colombia AR Sintética	2671	491	3,72	19 ^c	7,79 ^d
O-Thong et al. (2011)	Producción de hidrógeno a través de cultivos mixtos termofílicos.	Tailandia Industria de almidón	52300	9600	5,52	870	430
Pérez et al. (2009)	Tratamiento anaerobio, optimización de variables ambientales y operacionales	Colombia Rallandería tradicional	3400 - 5400	-	4,1 – 4,4	136 -197	22 – 48
Colin et al. (2007)	Tratamiento anaerobio, utilizando un filtro de flujo horizontal con bambú como medio de soporte.	Colombia Rallandería tradicional	5100 ± 320	375 ± 16	5,5 ± 0,8	112 ± 7	28 ± 3

^a Todas las medidas en mg.L⁻¹ a excepción del pH (Unidades) y lo que se especifique en esta nota; ^b Carbohidratos Totales; ^c Como Nitrógeno Amoniacal Total - NAT (mg N-NH₃.L⁻¹); ^d Como Ortofosfato (mg PO₄⁻³.L⁻¹).

3.4.3 Otros factores asociados con la producción de H₂ a través de la FO

Además de las características del inóculo, la factibilidad y efectividad de la producción biológica de H₂ a través de la FO, es dependiente de diversos factores ambientales y operacionales tales como la temperatura y el pH en la que se efectúa el proceso, y la presión parcial del H₂ en el reactor o sistema (Bharathiraja et al., 2016; Łukajtis et al., 2018; Prabakar et al., 2018).

3.4.3.1 Temperatura

La temperatura es uno de los principales factores ambientales que afectan los parámetros físicos como la viscosidad, la tensión superficial y las propiedades de transferencia de masa (Castellano-Hinojosa et al., 2018); su efecto en la producción biológica de H₂ puede explicarse termodinámicamente considerando los cambios en la energía libre de Gibbs y en la entalpía estándar de la conversión de glucosa a acetato, las cuales, asumiendo un rendimiento teórico de 4 mol de H₂ por mol de glucosa (ver **Ecuación 9**), son $\Delta G^0 = -176,1$ kJ/mol y $\Delta H^0 = +90,69$ kJ/mol respectivamente, valores que indican que la reacción es endotérmica y puede ocurrir de forma espontánea (Sinha & Pandey, 2011). De otro lado, la ecuación de Van't Hoff (ver **Ecuación 13** y **Ecuación 14**) puede utilizarse para explicar el efecto de la temperatura sobre la constante de equilibrio de la conversión de glucosa a acetato e H₂ (Smith et al., 2000 citados por Sinha & Pandey, 2011). Con el incremento en la magnitud de temperatura, la constante cinética de equilibrio también incrementa debido a que la reacción es endotérmica, en consecuencia, aumentando la temperatura de la fermentación de la glucosa y manteniendo constante la concentración del reactivo, aumenta la concentración de H₂.

$$\ln \frac{K_1}{K_2} = \frac{-\Delta H^0}{R} \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \quad \text{Ecuación 13}$$

Dónde:

K₁: Constante de equilibrio a la temperatura T₁; **K₂**: Constante de equilibrio a la Temperatura T₂; **ΔH⁰**: Variación de la entalpía

$$\frac{K_1}{K_2} = \frac{[H_2]_1^4 [CO_2]_1^2 [CH_3COOH]_1^2}{[H_2]_2^4 [CO_2]_2^2 [CH_3COOH]_2^2} \quad \text{Ecuación 14}$$

Desde el punto de vista operacional, los procesos fermentativos, pueden llevarse a cabo bajo condiciones mesofílicas (25 a 40°C), termofílicas (40 v 65°C), termofílicas extremas (65 a 80°C) o hipertermofílicas (>80°C) (Levin, Pitt, & Love, 2004). La selección de la magnitud óptima de temperatura del medio de reacción depende del tipo de microorganismo utilizado durante la fermentación, tanto para cultivos puros como para cultivos mixtos, ya que influye en la actividad de las enzimas específicas que participan en la producción de H₂ (Łukajtis et al., 2018), en ese sentido Mohammadi et al. (2012) indican que no puede establecerse una temperatura óptima exacta.

La temperatura afecta las reacciones metabólicas, autores como Ghimire et al. (2015) indican que el ácido acético es un subproducto dominante cuando la FO se efectúa en el rango de temperatura termofílica, mientras que el butirato se forma en mayor proporción cuando se efectúa bajo condiciones mesofílicas, afirmación que puede ser verificada en estudios de autores como Valdez-Vazquez et al. (2005). En contraste, autores como Shin et al. (2004) encontraron que bajo condiciones termofílicas, predomina la producción de butirato (entre 54 y 60%) evidenciando un mayor rendimiento de producción de H₂ respecto a las condiciones mesofílicas, asociando esto último a factores como la nula producción de propionato.

Respecto a los rendimientos en la producción de H_2 , una compilación de diferentes autores realizada por Dessi et al. (2018) indican que la mayoría de los estudios utilizando cultivos mixtos que se han desarrollado a 55, 60 o 70°C, generalmente han obtenido mayores rendimientos de H_2 que en ensayos efectuadas en el rango mesofílico con un inóculo y un sustrato similar, debido entre otros aspectos a que altas temperaturas afectan positivamente la cinética de las reacciones y el crecimiento de los microorganismos. Así mismo, la temperatura también está relacionada con el sustrato: el pretratamiento térmico (70 a 180°C según diversos estudios) también se ha aplicado a materiales lignocelulósicos para aumentar su solubilización y promover la hidrólisis enzimática (Bundhoo et al., 2015; Elbeshbishy, Hafez, Dhar, & Nakhla, 2011).

No obstante, autores como Yasin et al. (2013) indican que la producción de H_2 a través de la FO bajo temperatura en el rango mesofílico es rentable y fácil de operar a una escala industrial, con lo cual concuerdan autores como Akutsu et al. (2009), aunque estos últimos mencionan aspectos operacionales a tenerse en cuenta, citando el caso puntual de que no existe claridad en cuanto a la producción continua y estable sin necesidad del tratamiento previo del inóculo, aspecto que sí está definido cuando la FO se efectúa bajo condiciones termofílicas.

3.4.3.2 pH

El pH es considerado como uno de los parámetros operativos más importantes y sensibles que afectan el rendimiento de la producción de H_2 a través de la FO, ya que puede cambiar el espectro de los subproductos generados, la estructura de la comunidad microbiológica y las funciones metabólicas intracelulares, como la actividad de las enzimas hidrogenasa (Elbeshbishy et al., 2017). Por otro lado, como no todos los microorganismos soportan todas las magnitudes de pH, este aspecto es fundamental para inhibir aquellos consumidores de H_2 , como es el caso de las arqueas metanogénicas, sensibles a pH entre 5,5 y 6,0 unidades (Bharathiraja et al., 2016; Kothari, Singh, Tyagi, & Tyagi, 2012).

Desde el punto de vista termodinámico Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo (2009) haciendo referencia al trabajo de Voolapalli & Stuckey (2001) indican que las condiciones acidogénicas (por ejemplo valores de pH alrededor de 5) favorecen la producción de H_2 si se analizan las condiciones de equilibrio entre el formiato y el H_2 (ver **Ecuación 15** a **Ecuación 17**) y, en las que se evidencia que la relación de formiato/ H_2 varía exponencialmente con el pH.



$$\frac{[HCOO^-]}{H_{2aq}} = \frac{K K_{CO_2} p_{CO_2} K_A}{K_{H_2} [H^+]} \quad \text{Ecuación 16}$$

$$\frac{[HCOO^-]}{H_{2aq}} = \frac{K K_{CO_2} p_{CO_2} K_A}{K_{H_2} [H^+]} \times 10^{pH} \quad \text{Ecuación 17}$$

Donde:

K_{H_2} : Constante de Henry para el hidrógeno; K : Constante de equilibrio (1,31 a 35°C); K_{CO_2} : Constante de Henry para el dióxido de carbono y K_A : Primera constante de disociación para el ácido carbónico.

De otro lado, también se ha demostrado que las bacterias productoras de hidrógeno podrían suprimirse si se aplica un pH inicial demasiado bajo y podría afectar la utilización del sustrato (Kim et al., 2011; Yasin et al., 2013), por ejemplo, de acuerdo con la revisión realizada por Elbeshbishy et al. (2017) a pH ácido (menores de 4) típicamente se observa un rendimiento menor en la producción de H_2 , debido a la formación de metabolitos ácidos y alcohólicos que pueden penetrar en la membrana de la célula de los microorganismos e interferir con sus actividades metabólicas, mientras que valores de pH neutro o alcalino ($pH > 7$) facilita la acumulación de propionato, metabolito que no conlleva a la producción de dicho biogás. De forma complementaria, autores como Yasin et al. (2013) indican que ajustar el pH inicial entre 7,0 y 8,0 y permitir su disminución durante el proceso a valores entre 5,5 y 6,0 también resulta en altos rendimientos de producción de H_2 , debido a que se favorece la adaptabilidad de los microorganismos a la etapa inicial de hidrólisis.

En síntesis, de acuerdo con una revisión de Blanco & Rodríguez (2012) estudios comparativos enfocados en el efecto del pH en la producción de H_2 han mostrado que el rango de pH óptimo para lograr la máxima producción de H_2 está entre 4,5 y 6,0; autores como Nikolaidis & Poullikkas (2017) citando otros estudios amplían este rango a 6,5 mientras que otros lo acotan desde 5,5 (Lin et al., 2012), este último concordante con los mayores rendimientos en ensayos de Actividad Hidrogénica Específica – AHE- realizados por Trevisan et al. (2015). Otros estudios han aplicado como valor óptimo el de 5.5 ± 0.1 (De Sá et al., 2013; Fan, Li, Lay, Hou, & Zhang, 2004; Fang & Liu, 2002; Khanal, Chen, Li, & Sung, 2004; Van Ginkel, Sung, & Lay, 2001).

3.4.3.3 Presión parcial

Teniendo en cuenta la producción de H_2 a través de la reducción de protones a través de la ferredoxina- F_{red} o el NADH, la presión parcial del H_2 constituye un factor crítico en la FO (Bundhoo & Mohee, 2016; K.-S. Lee, Tseng, Liu, & Hsiao, 2012; Levin et al., 2004). Este aspecto es detallado por autores como Angenent et al. (2004) y Mandal et al. (2006) quienes en primera instancia indican que la ferredoxina es una proteína hierro-azufre de bajo potencial redox ($E^{\circ}_{Fd} \approx -400$ mV, dependiendo de la fuente), mientras que el NADH tiene un potencial redox más alto ($E^{\circ}_{NADH} = -320$ mV). Los mismos autores indican que la capacidad de la ferredoxina reducida y el NADH para reducir protones está determinada por el potencial redox de la reacción neta en condiciones reales. Suponiendo que las concentraciones intracelulares de las formas oxidada y reducida de ferredoxina y NADH son aproximadamente iguales, la producción de H_2 se vuelve termodinámicamente desfavorable a presiones parciales de H_2 determinadas según la **Ecuación 18**.

$$P_{H_2, max} \leq \exp \left\{ \frac{2F(E^{\circ}_{H_2} - E^{\circ}_X)}{RT} \right\} \quad \text{Ecuación 18}$$

Donde:

$E^{\circ}_{H_2}$ = Potencial redox protones H_2 (-414 mV); E°_X = Potencial redox del donador de electrones; F= Constante de Faraday; R= Constante de los gases ideales; T= Temperatura absoluta

Así, mientras la presión parcial de H_2 sea inferior a 0,3 atm, la producción de H_2 puede continuar transfiriendo electrones desde Fd_{red} , que contiene electrones de la descarboxilación oxidativa del piruvato por la Piruvato:FerredoxinaOxidorreductasa (PFOR). De otro lado, la oxidación de NADH por NADH:FdOxidorreductasa (NFOR) puede generar Fd_{red} que posteriormente, genera hidrógeno adicional cuando la presión parcial se mantiene inferior a 60 Pa; de lo contrario, el NADH es oxidado mediante otras rutas, tales como la fermentación butírica (etapa 4 en la **Figura 9**), aunque estudios han mostrado que dichos rangos limitantes de presión parcial pueden superarse hasta cierta medida con el incremento de la temperatura de reacción (por ejemplo 70°C) (Thong, 2017).

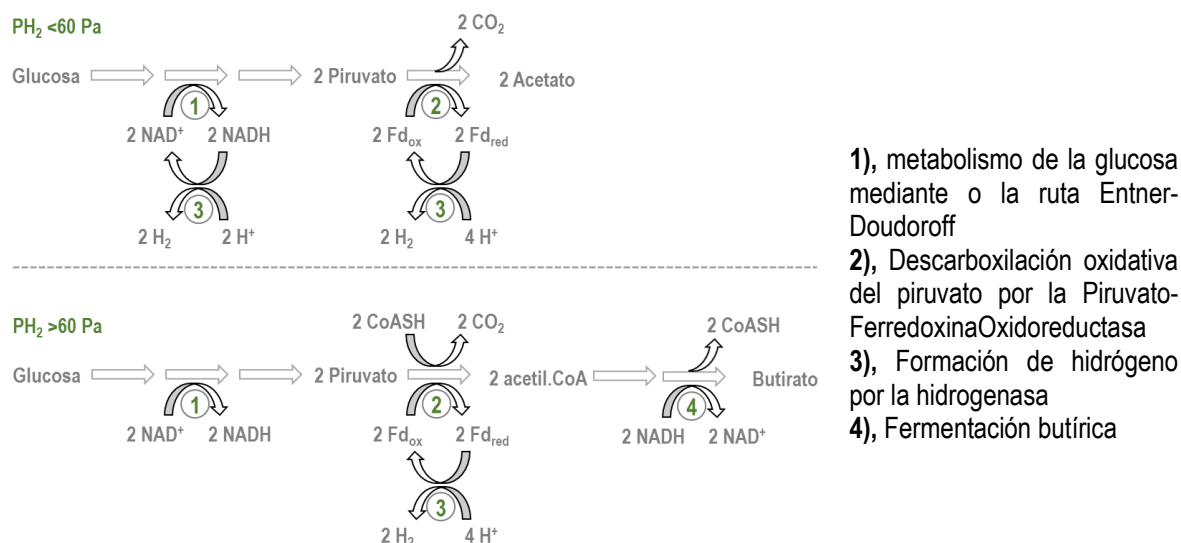


Figura 9. Efecto de la presión parcial de hidrógeno sobre su producción en la etapa fermentativa de la DA
Fuente: Angenent et al. (2004)

Adicionalmente, la regulación de la presión parcial de H₂ también puede modular la homoacetogénesis e intensificar la producción de este biogás (Liu & Wang, 2017; Saady, 2013; Sivagurunathan et al., 2016), por lo que diversos autores han propuesto diversas estrategias para reducir la presión parcial de H₂ en el proceso de fermentación, que incluyen entre otros, mayores volúmenes de headspace o volumen de almacenamiento del gas en el reactor (Oh et al., 2009), liberación continua de gas (Chang, Li, Liu, & Yu, 2012; Esquivel-Elizondo et al., 2014; Logan, Oh, Kim, & Van Ginkel, 2002), burbujeo con un gas como CO₂ y N₂ (Kim, Han, Kim, & Shin, 2006; Mizuno, Dinsdale, Hawkes, Hawkes, & Noike, 2000), extracción al vacío (Lee et al., 2012; Liu & Wang, 2017) y separación a través de membrana (Ramírez-Morales, Tapia-Venegas, Toledo-Alarcón, & Ruiz-Filippi, 2015). De acuerdo con el principio de Le Chatelier y la reacción de la transformación de glucosa a acetato (ver **Ecuación 9**), la remoción del CO₂ de la fase gaseosa en el proceso de fermentación, también favorece la producción de H₂ (Mandal et al., 2006; Nasr et al., 2015; Park, Hyun, Oh, Logan, & Kim, 2005).

3.5 Consideraciones finales

La producción de H₂ a través de la FO, se identifica como una opción promisoría para suplir parte de la creciente demanda energética a nivel mundial y minimizar los efectos adversos al ambiente, causados por el uso de combustibles fósiles y la disposición inadecuada de residuos sólidos y líquidos.

Una de las estrategias que ha permitido mayores rendimientos en la producción de H₂ a través de la FO cuando se utilizan inóculos mixtos, es el pretratamiento térmico, el cual se concibe como un método efectivo, simple y relativamente económico para la selección de microorganismos productores de dicho biogás. De otro lado, el marco referencial de la aplicación de la FO utilizando sustratos de alta biodegradabilidad y fácilmente acidificables/fermentables como la glucosa, ha sentado las bases para que los residuos de origen agroindustrial como los generados en el proceso de extracción de almidón de yuca, caracterizados por ser ricos en carbohidratos, constituyan un sustrato potencial para la producción de H₂.

Teniendo en cuenta que la selección y efectividad de cualquier tipo de pretratamiento de un inóculo depende del origen y características del mismo, de las características del sustrato, de los costos de inversión y de operación entre otros aspectos, es casi imposible llegar a un consenso sobre cuáles son las condiciones

operacionales óptimas y llegar a su estandarización. De acuerdo con lo anterior, es necesaria la búsqueda de estrategias viables para efectuar el pretratamiento de un inóculo bajo las condiciones específicas de cada escenario de aplicación. Desde este punto de vista, evaluar el efecto del pretratamiento térmico sobre la AHE como herramienta para la selección de inóculos en la fermentación oscura del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, constituye una contribución sobre los criterios de decisión encaminados hacia su aplicación en sistemas a gran escala en la región, así como un aporte sobre las estrategias de minimización de la contaminación ambiental por el vertimiento del tipo de residuos líquidos objeto de estudio sobre el ambiente.

4 MATERIALES Y METODOS

La etapa experimental del presente trabajo de investigación, se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental, adscrito al Área Académica de Ingeniería Sanitaria y Ambiental de la Universidad del Valle en Santiago de Cali-Colombia. Así mismo, la ejecución de actividades puntuales para el cumplimiento de los objetivos planteados (Recolección de inóculos y agua residual), requirió actividades en los municipios de Ginebra y Candelaria en el departamento del Valle del Cauca y en el Municipio de Santander de Quilichao, Departamento del Cauca, cuya ubicación geográfica se presenta en la **Figura 10**.

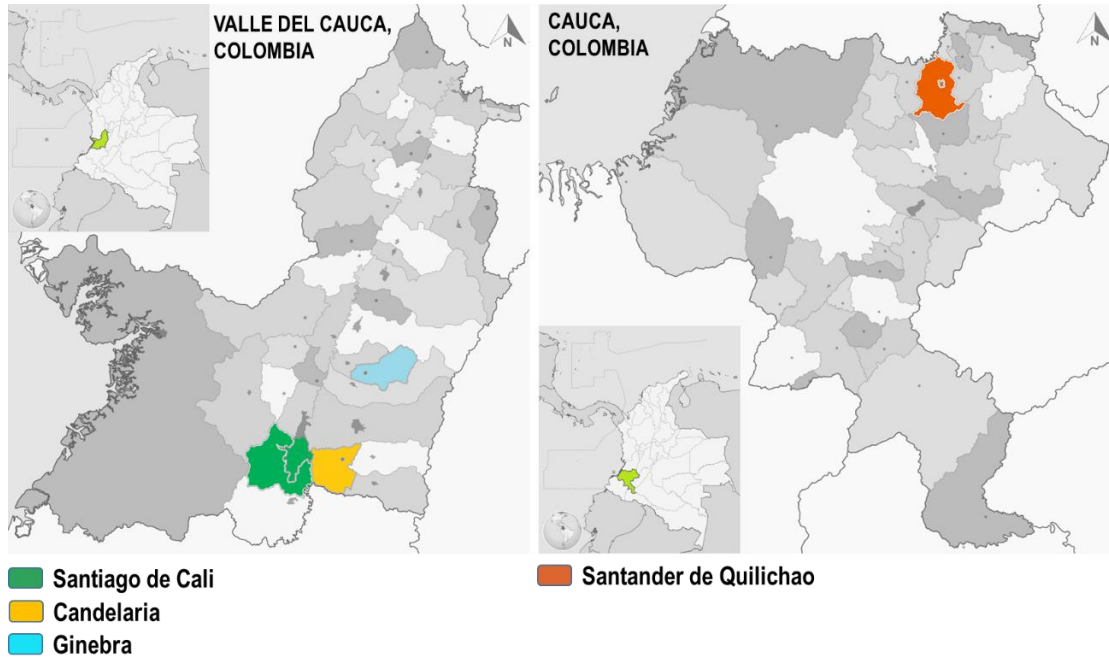


Figura 10. Ubicación geográfica de la zona de estudio

Las actividades realizadas para el cumplimiento de los objetivos planteados, se desarrollaron en dos fases: **Fase I:** Evaluación del efecto del pretratamiento térmico sobre la AHE de tres inóculos, a tres magnitudes de temperatura y de tiempo de exposición y **Fase II:** Evaluación del efecto del pretratamiento térmico del inóculo, sobre la FO del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca - ARY. La **Figura 11** muestra gráficamente la asociación de las fases anteriormente descritas, con los objetivos planteados:

4.1 Fase I: Evaluación del efecto del pretratamiento térmico sobre la AHE de tres inóculos, a tres magnitudes de temperatura y de tiempo de exposición

Bajo la concepción de que el pretratamiento térmico de un inóculo es un método efectivo, simple, de amplia aplicación y relativamente económico para favorecer el predominio de microorganismos productores de hidrógeno en un inóculo mixto (De Sá et al., 2011; Rafieenia et al., 2018), se evaluó el efecto del pretratamiento térmico sobre la AHE de los tres inóculos descritos en la **Tabla 5**, a tres magnitudes de temperatura (T) y de tiempo de exposición (t), utilizando un sustrato altamente biodegradable como la glucosa. Esta evaluación permitió identificar y acotar la combinación de T, t e inóculo con mayores rendimientos en la producción de H₂ bajo condiciones que pueden considerarse “ideales” (alta biodegradabilidad del sustrato y adición de nutrientes específicos) para aplicarse posteriormente en la FO de un sustrato complejo rico en carbohidratos en forma soluble y particulada como el ARY. El desarrollo de la Fase I se efectuó a través de cinco actividades principales:

a), Selección, recolección y caracterización de inóculos para ensayos de AHE; b), Adaptación de inóculos al sustrato (Glucosa) para ensayos de AHE; c), Pretratamiento térmico de inóculos adaptados a Glucosa; d), Ensayos de AHE y e), Seguimiento y evaluación del efecto del pretratamiento térmico de inóculos sobre su AHE.

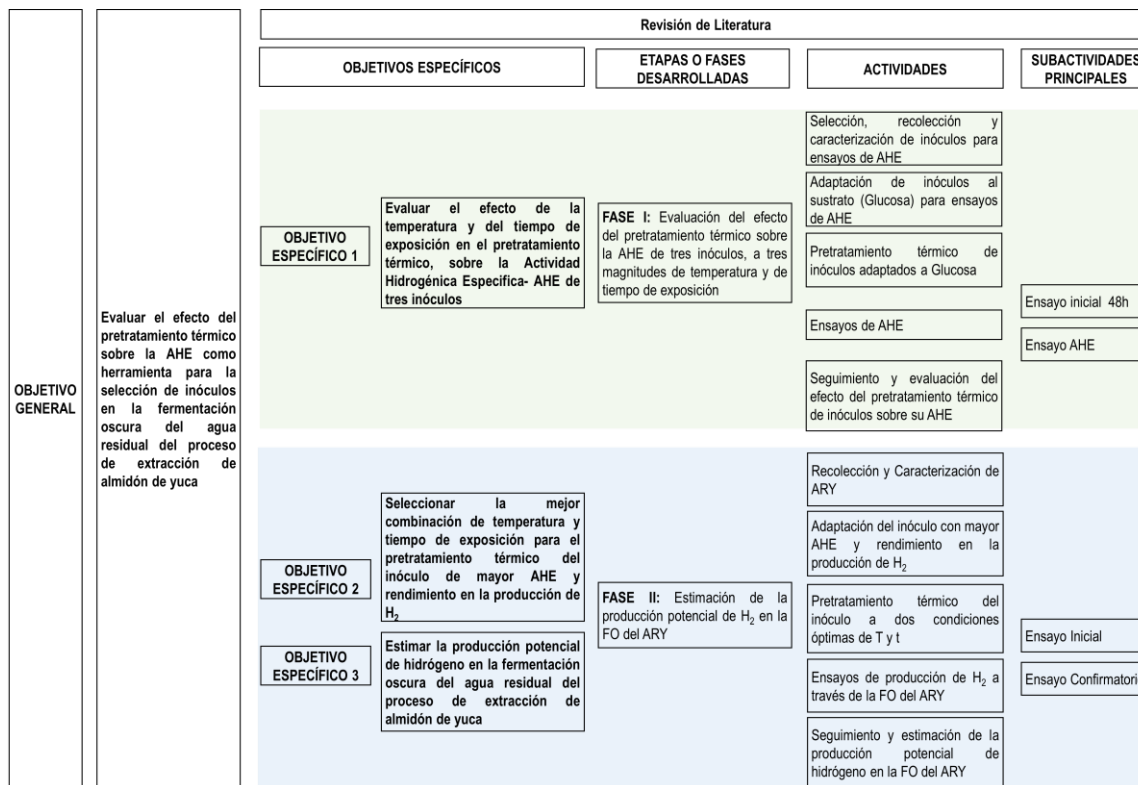


Figura 11. Actividades ejecutadas en cumplimiento de los objetivos planteados

4.1.1 Selección, recolección y caracterización de inóculos para ensayos de AHE

Se realizó una selección de tres inóculos mixtos que por su origen, relativa facilidad de adquisición en la región y características fisicoquímicas y microbiológicas citadas en la literatura, permitieron considerarlos factibles para su evaluación en ensayos de Actividad Hidrogenónica Específica - AHE y para la producción de hidrógeno a través de la FO del ARY. La descripción general de los inóculos seleccionados se presenta en la **Tabla 5**, los cuales se caracterizaron de acuerdo con los parámetros fisicoquímicos y técnicas de medición listados en la **Tabla 6**.

Tabla 5. Inóculos utilizados en el estudio

Inóculo	Origen	Lugar de recolección
Lodo Anaerobio Granular Metanogénico - LAGM	Sistema de tratamiento anaerobio de AR del sacrificio de ganado bovino y porcino – Reactor Metanogénico.	Industria productora y comercializadora de Carne, Municipio de Candelaria - Valle del Cauca.
Lodo Anaerobio Acidogénico - LAA	Sistema de tratamiento anaerobio de AR del sacrificio de ganado bovino y porcino – Reactor Acidogénico.	Industria productora y comercializadora de Carne, Municipio de Candelaria - Valle del Cauca.
Lodo Anaerobio Floculento - LAF	Sistema de tratamiento anaerobio de agua residual domestica - ARD – Reactor UASB.	Estación de investigación y de transferencia de tecnología en AR, Municipio de Ginebra – Valle del Cauca.

Tabla 6. Caracterización inicial de los tres inóculos seleccionados

Característica/Parámetro fisicoquímico	Unidades	Método/Técnica de medición	Fuente
Apariencia	Parámetro cualitativo	Observación a simple vista	
SSV	mg.L ⁻¹	Gravimétrico	(APHA, 2005)
SST	mg.L ⁻¹	Gravimétrico	(APHA, 2005)
pH	Unidades	Potenciométrico	(APHA, 2005)
AME	mLCH ₄ .(gSSV.d) ⁻¹	Manométrico	(Aquino et al., 2007; Torres & Pérez, 2010)

Diversos estudios asociados con la producción biológica de H₂ a través de la FO denota la existencia de una amplia variedad de fuentes para ser utilizadas como inóculo (Chang et al., 2011; Ghimire et al., 2015), por lo que los inóculos descritos en la **Tabla 5** se seleccionaron de acuerdo con los criterios listados en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Descripción de los criterios para la selección de Inóculos utilizados en el estudio

Criterio	Descripción
PTAR como fuente de Origen del inóculo	En el contexto de la DA, la obtención de un inóculo activo y diverso de otro reactor anaerobio o PTAR en funcionamiento y con buen desempeño, es una práctica comúnmente adoptada para lograr una producción efectiva y estable de biogás con periodos de arranque cortos (Wojcieszak et al., 2017); desde el punto de vista operativo, se reconocen dos razones principales que motivan dicha práctica: i) las PTAR (como las de tratamiento biológico de agua residual doméstica) se encuentran relativamente en todo el mundo y, ii) aunque las PTAR sean diferentes, tienen características comunes (Raposo, De La Rubia, Fernández-Cegri, & Borja, 2011). Para el caso específico de la producción de H ₂ a través de la FO, los Lodos Anaerobios – LA provenientes de PTAR o biodigestores, también han sido identificados como los más utilizados como inóculo (Alibardi et al., 2012; Ruggeri et al., 2015).
Lodo Anaerobio	Además de los lodos biológicos de PTAR de tipo anaerobio, los lodos aerobios – LAE como el lodo activado, han demostrado ser factibles para ser utilizados como inóculo en la producción de H ₂ a través de la FO (Chang et al., 2011; Dessì et al., 2018; K. Zhang et al., 2011); no obstante, se ha identificado en diversos estudios que su rendimiento en la producción de H ₂ es inferior comparado con los LA (Baghchehsaraee et al., 2008). Así mismo, el LA garantiza la presencia de microorganismos anaerobios estrictos, cuyas rutas metabólicas asociadas con la FO permiten un mayor rendimiento en la producción de H ₂ respecto a los microorganismos de tipo facultativo (Cabrol et al., 2017); específicamente el LA puede garantizar la presencia de microorganismos como la mayoría de especies del género Clostridium, reconocidos por ser productores de H ₂ y capaces de transformar una amplia variedad de carbohidratos (Łukajtis et al., 2018; J. Wang & Yin, 2017).
LA Granular Metanogénico - LAGM	En el contexto de la DA, un lodo granular – LG representa un inóculo con alta concentración de SSV (Biomasa), buenas características de sedimentabilidad y alta resistencia al efecto de lavado o pérdida en el efluente (H. Liu & Fang, 2003; Seghezzo, Zeeman, Van Lier, Hamelers, & Lettinga, 1998), que permiten la operación con altas cargas orgánicas en reactores más compactos (Y. Liu, Xu, Yang, & Tay, 2003). Adicionalmente, el LG contiene las diferentes poblaciones microbiológicas que participan en la DA bajo una estructura granular, facilitando las relaciones sintróficas e intercambio de metabolitos (Liu et al., 2003; Chernicharo, 2007). Las ventajas operacionales de un LG han sido reconocidas recientemente en los procesos de FO para la producción de H ₂ (Pugazhendhi, Kumar, & Sivagurunathan, 2019; Zinatizadeh, Mirghorayshi, Birgani, Mohammadi, & Ibrahim, 2017), así mismo, desde el punto de vista bioquímico, las

	relaciones sintróficas favorecidas por la estructura del LG metanogénico, aseguran la presencia de microorganismos productores y consumidores de H ₂ , estos últimos pudiéndose inhibir mediante un pretratamiento previo (Abreu et al., 2010; Alibardi et al., 2012; B. Hu & Chen, 2007).
LA Acidogénico - LAA	En los procesos de DA, mayoritariamente se utilizan sistemas de una sola etapa, en los cuales la hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis ocurren en el mismo reactor; no obstante, se ha demostrado que su separación (en dos etapas: acidogénesis y metanogénesis) es favorable para el tratamiento de residuos líquidos complejos (Carvalho et al., 2018), maximiza la producción del biogás generado en cada una de ellas (H ₂ /CH ₄) y favorece la estabilidad del proceso bajo un enfoque integral (Massanet-Nicolau, Dinsdale, Guwy, & Shipley, 2015). En ese sentido, la obtención de un inóculo de un reactor acidogénico, puede garantizar la presencia de una comunidad microbológica adaptada a las condiciones específicas de pH, temperatura, TRH, carga orgánica y demás, necesarias para la hidrólisis y acidogénesis de un sustrato complejo y consecuentemente, para la producción de H ₂ .
LA proveniente del tratamiento de agua residual doméstica y municipal	Los inóculos con mayor disponibilidad en el país para la aplicación de procesos de DA, son los LA provenientes de PTAR municipales (Parra Orobio et al., 2016). Los LA provenientes PTAR o de biodigestores asociados con el tratamiento de AR doméstica y/o municipal contienen una comunidad microbológica mixta que los hace factibles para la producción de H ₂ a través de la FO (De Sá et al., 2013; Chiu Yue Lin & Cheng, 2006; Pendyala et al., 2012; J. Wang & Wan, 2008b).
LA proveniente de un sistema de tratamiento anaerobio de AR del sacrificio de ganado	Además de los atributos operacionales y bioquímicos que ofrece un LG en la producción de H ₂ a través de la FO, se ha reconocido que aquellos provenientes de sistemas de tratamiento de agua residual del sacrificio de ganado (adaptado a sustrato con alto contenido de proteínas) son factibles para la obtención de este biogás a partir de sustratos con alto contenido de carbohidratos (Lazaro, Perna, Etchebehere, & Varesche, 2014; Penteado, Lazaro, Sakamoto, & Zaiat, 2013; Rosa, Santos, Sakamoto, Varesche, & Silva, 2014). En el contexto local, se ha demostrado que el LG en referencia es factible para el tratamiento anaerobio del ARY (Colin et al., 2007) y específicamente, factible para ser utilizado como inóculo en la producción de H ₂ a partir de este tipo de AR agroindustrial (Barrios, 2015; Yela Larrahondo & Peña Castañeda, 2015).

4.1.2 Adaptación de inóculos al sustrato para ensayos de AHE

Aunque los ensayos de AHE se efectuaron con un sustrato de alta biodegradabilidad (Glucosa), cada inóculo descrito en la **Tabla 5**, se sometió a un periodo de adaptación para que la comunidad microbológica presente en él (adaptada según su origen a un sustrato rico en proteínas para el caso del LAGM y LAA y a un sustrato constituido por una mezcla de proteínas, carbohidratos y lípidos entre otras sustancias, pero en menor concentración para el caso del LAF), asimile adecuadamente el cambio de sustrato (carbohidratos) sin generar un estrés en los microorganismos, aspecto que también cumplió con el propósito de extraer el agua residual de origen remanente en cada uno de ellos.

Para lo anterior, cada inóculo fue sometido a un periodo de adaptación que consistió en el aumento gradual de la concentración del sustrato, en un reactor en flujo discontinuo (Batch) a temperatura ambiente y debidamente cerrado para favorecer el predominio de condiciones anaerobias de acuerdo con (Hurtado Grueso & Muñoz Zambrano, 2013). El criterio de decisión para establecer que el inóculo se adaptó al nuevo sustrato, correspondió a su respuesta en reducir el contenido de carbohidratos totales en un porcentaje igual o superior al 80%. La adaptación de cada inóculo inició con una concentración de glucosa de 2.500 mg.L⁻¹ equivalente al 50% de la concentración adoptada para la ejecución de los ensayos de AHE, finalizando con la adición completa del sustrato en un periodo inferior a 2 días, en el cual se observó la reducción de carbohidratos establecida para

determinar su adaptación. Al reactor se le acondicionó una manguera para la evacuación del biogás generado. Los volúmenes correspondientes al inóculo y sustrato adicionado, tuvieron una proporción de 60% y 40% del volumen de reacción (3,5L) respectivamente, como se muestra en la **Figura 12**.

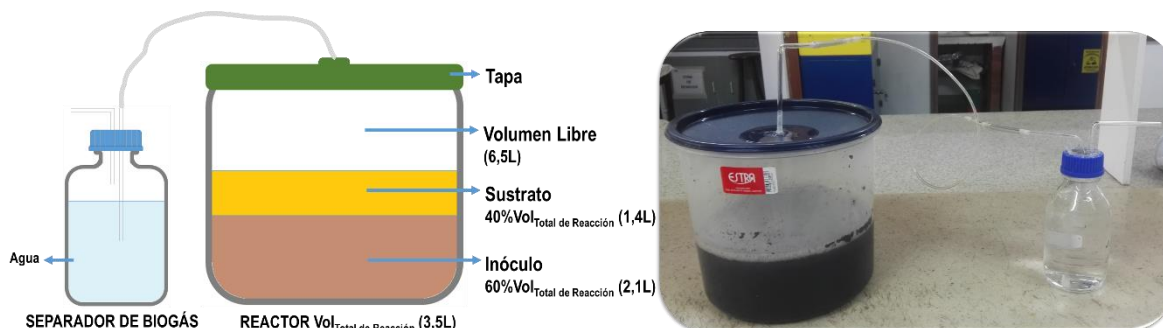


Figura 12. Adaptación de inóculos a sustrato para ensayos de AHE

4.1.3 Pretratamiento térmico de inóculos para ensayos de AHE

Cada inóculo adaptado al sustrato de estudio (glucosa) se sometió a un pretratamiento térmico a tres magnitudes de temperatura -T (75, 85 y 100°C) y tres magnitudes de tiempo de exposición -t (15, 30 y 45 min), las cuales fueron consideradas factibles para lograr el predominio de microorganismos productores de hidrógeno - BPH de acuerdo con estudios desarrollados por (Baghchehsaraee et al., 2008; Kan, 2013; J. Wang & Yin, 2017; Y. Y. Wang et al., 2011); de otro lado, en las magnitudes mencionadas, se incluyó la temperatura frecuentemente utilizada (100°C) (Wong et al., 2014).

Previo a la ejecución del pretratamiento térmico, se tomó muestra de cada inóculo adaptado para la determinación del contenido de SST y SSV; de acuerdo con esta última variable y con la relación Sustrato/Inóculo a garantizar en cada reactor para los ensayos de AHE, se calculó el volumen de inóculo a pretratar térmicamente. Para efectuar el pretratamiento térmico (ver **Figura 13**), cada inóculo en el volumen determinado se adicionó a bandejas de aluminio adaptando la metodología descrita por autores como (Y.-T. Fan, Zhang, Guo, Xing, & Fan, 2006; Logan et al., 2002; Wu, Yang, & Guo, 2009) y sometido a las diferentes magnitudes de T y t en un horno a presión atmosférica.

4.1.4 Ensayos de AHE

La evaluación del efecto del pretratamiento térmico de tres inóculos, se realizó a través de ensayos de AHE, debido que constituyen una herramienta útil, rápida y relativamente económica para evaluar el máximo potencial de producción de H₂ de un inóculo, a partir de un determinado sustrato (Pecorini, Baldi, & Iannelli, 2019; Trevisan, 2010; Trevisan et al., 2015). Así mismo, se tuvo en cuenta que a partir de los ensayos de AHE es posible proponer parámetros de control para la maximización de la producción de H₂ en reactores anaerobios (de flujo continuo por ejemplo), identificar factores de inhibición y establecer relaciones cinéticas entre sustrato, productos generados (H₂, AGVs) y microorganismos (Mu et al., 2014; Trevisan, 2010).

Para cada inóculo adaptado a glucosa y pretratado térmicamente de acuerdo con las variables de T y t evaluadas, se realizaron ensayos de AHE bajo condiciones mesofílicas (35°C) según la metodología descrita por (Trevisan et al., 2015), mediante el seguimiento de la producción de biogás por el método manométrico.

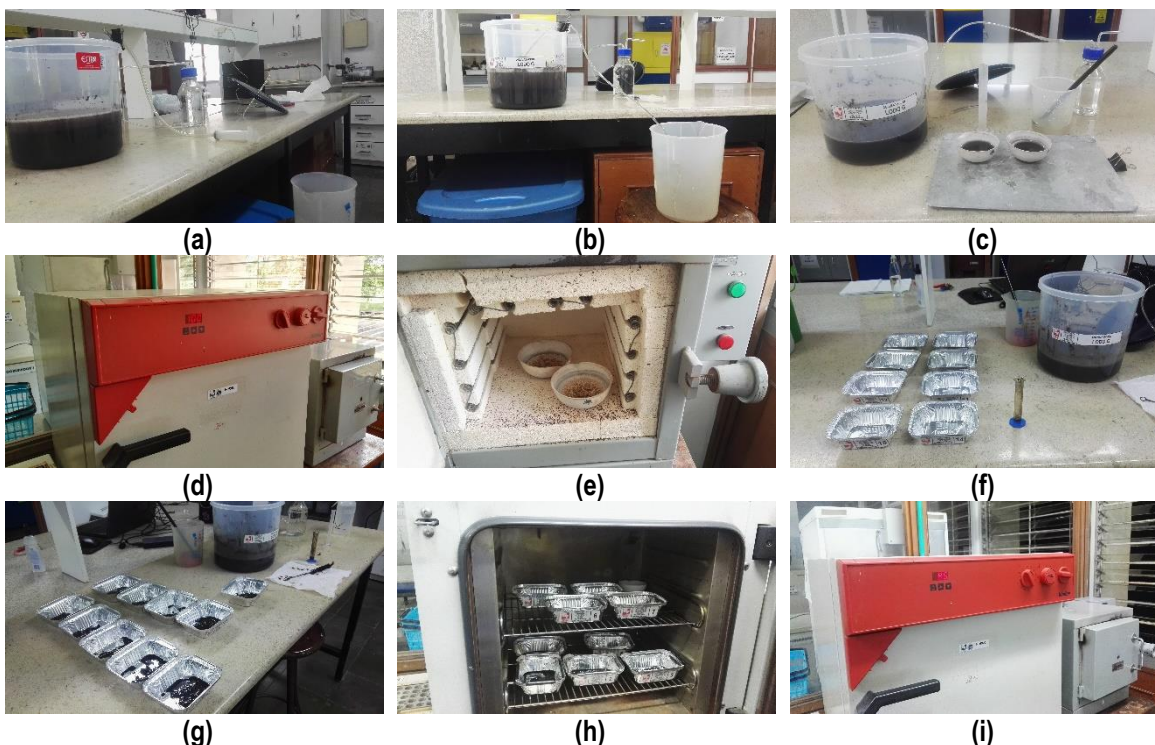


Figura 13. Pretratamiento térmico de inóculos para ensayos de AHE: (a) y (b), Retiro de sobrenadante del inóculo adaptado; (c), toma de muestra de inóculo; (d), Determinación de SST; (e), Determinación de SSV; (f) y (g), adición de inóculo a bandejas de aluminio; (h) e (i), Pretratamiento térmico en horno.

La unidad experimental para los ensayos de AHE fue un reactor de flujo discontinuo, que consistió básicamente en una botella de vidrio ámbar de 650 mL, en la cual se adicionó una suspensión conformada por la mezcla Inóculo + Sustrato + Macro/Micronutrientes en un volumen de reacción de 400 mL, garantizando 250 mL de Headspace para el almacenamiento del biogás generado (Ver **Figura 14**). El reactor fue acondicionado con una unidad interna de caucho no reactiva, en la cual se adicionaron perlas de NaOH con el objetivo de absorber el CO_2 que se encuentra en el biogás producido en el proceso biológico, estrategia reconocida por diversos autores (Mandal et al., 2006; Nasr et al., 2015; Park et al., 2005) como favorable desde el punto de vista termodinámico, al reducir la presión parcial del CO_2 en la fase gaseosa y dirigir la producción hacia el H_2 y bioquímico, al evitar ser utilizado por los microorganismos homoacetogénicos; además, de permitir que el biogás colectado estuviera compuesto mayoritariamente por la sustancia de interés (H_2). La unidad interna o “Unidad de absorción de CO_2 ”, también cumplió con la función de anillo o “empaque” para el sellado hermético de los reactores, de tipo serológico, compuesto por septa plástica (20 mm de ancho y 5 mm de espesor aprox.) y agrafe metálico (30 mm de ancho y 10 mm de espesor aprox.).

El cierre de tipo serológico en cada uno de los reactores, facilitó la medición continua de la presión ejercida por el biogás, así como su extracción para posterior análisis de cromatografía. Así mismo, se incorporó a la unidad experimental una barra magnética que junto con un agitador, promovió la agitación continua del medio de reacción, estrategia operacional que permitió minimizar la fracción disuelta de H_2 en el medio líquido y favorecer su transferencia hacia la fase gaseosa, además de favorecer un mayor contacto sustrato:inóculo (Guo, Trably, Latrille, Ne Carrè, & Steyer, 2010; Lay, 2000; Lee et al., 2012). Las anteriores características de la unidad experimental, fueron adaptadas de acuerdo con lo expuesto por (Rudrum, 2005; Scaglione, Caffaz, Ficara, Malpei, & Lubello, 2008) y también fueron adecuadas y mejoradas teniendo en cuenta el contexto local, según los estudios realizados en el grupo de investigación ECCA de la Universidad del Valle por autores como (Barrios, 2015; Hurtado Grueso & Muñoz Zambrano, 2013; Yela Larrahondo & Peña Castañeda, 2015).

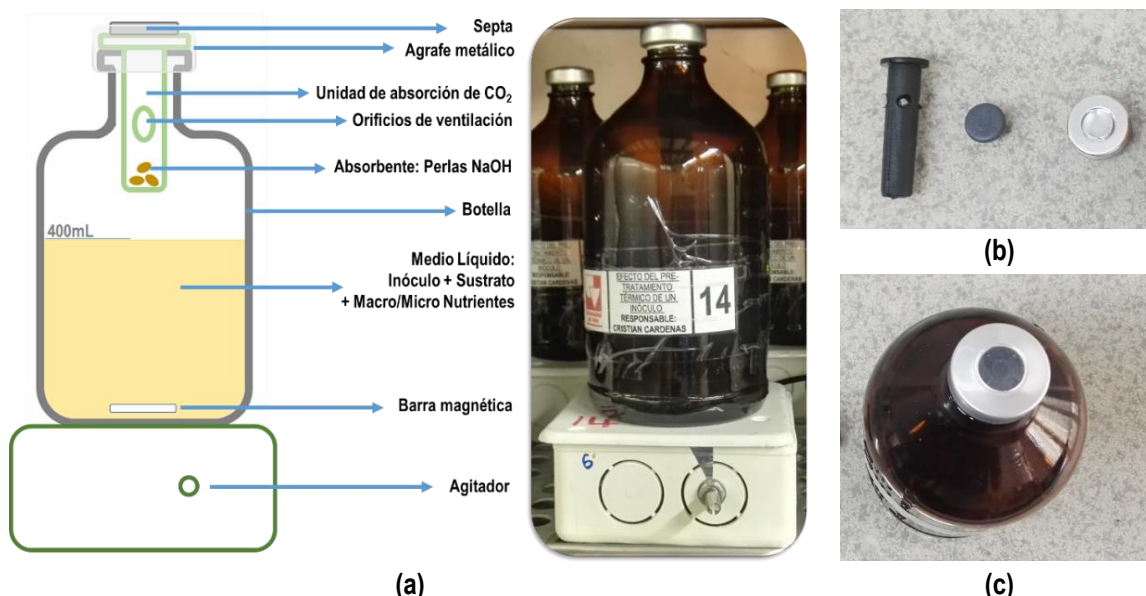


Figura 14. Unidad experimental, ensayo de AHE. (a), Montaje; (b), Unidad de absorción de CO₂, septa plástica y agrafo metálico; (c), Cierre tipo serológico.

4.1.4.1 Sustrato y medio de reacción para los ensayos de AHE

Los ensayos de AHE se efectuaron utilizando glucosa como sustrato, sustancia que ha sido reconocida como referencia, debido a su alta biodegradabilidad y la afinidad con los microorganismos productores de H₂ (Łukajtis et al., 2018; Tapia-Venegas et al., 2015; J. Wang & Wan, 2009). La concentración de glucosa y de SSV adicionados a cada reactor fue de 5,0 g.L⁻¹ y 2,5 g.L⁻¹ respectivamente, valores que se encuentran en el rango recomendado según la metodología propuesta por (Trevisan et al., 2015). La DQO correspondiente a la concentración de glucosa adicionada fue de 5,3 ± 0,1g.L⁻¹, la cual representó una relación Sustrato:Inóculo (mgDQO_{Glucosa}.L⁻¹:mgSSV_{Lodo}.L⁻¹) cercana a 2,0, valor que de acuerdo con el estudio de Yela & Peña (2015) puede favorecer una mayor producción de H₂ tratando agua residual agroindustrial como la ARY.

El pH del medio de reacción fue ajustado mediante la adición de HCl (0,16N) a 5,40 ± 0,05, el cual se encuentra dentro del rango óptimo para la producción de H₂ (Bharathiraja et al., 2016; Blanco Londoño & Rodríguez Chaparro, 2012; Van Ginkel et al., 2001), y específicamente corresponde a un valor óptimo cuando se utiliza ARY como sustrato (Barrios, 2015). A cada reactor se le adicionaron macro y micronutrientes de acuerdo con la **Tabla 8**, adaptando la metodología descrita por (Baghchehsaraee et al., 2008; C Y Lin & Lay, 2005; Trevisan et al., 2015), con el objetivo de garantizar los requerimientos nutricionales para la actividad enzimática y potencializar la producción de H₂.

Tabla 8. Macro y micronutrientes adicionados a cada reactor en el ensayo de AHE

Nutriente	Concentración (mg.L ⁻¹)	Nutriente	Concentración (mg.L ⁻¹)
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.000	K ₂ HPO ₄	250
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5	MgCl ₂ .6H ₂ O	40
CuSO ₄ .5H ₂ O	5	MnSO ₄ .4H ₂ O	3,8
FeSO ₄ .7H ₂ O	1	NH ₄ Cl	50
KI	12,5	NiCl ₂ .6H ₂ O	2,5
KCl	130	ZnCl ₂	2,5

Los ensayos de AHE se realizaron por duplicado para cada una de las magnitudes de T y t evaluadas con cada inóculo, e incluyeron un Control y un Blanco a los cuales se les adicionó el inóculo sin pretratamiento térmico; para los primeros se mantuvo la relación Sustrato:Inóculo mientras que a los reactores Blanco no se les adicionó sustrato, aforándose entonces el volumen de reacción con agua destilada.

La **Figura 15** muestra la configuración experimental de los ensayos realizados en la Fase I, la cual incluyó la ejecución de un ensayo previo para dos inóculos (LAGM y LAF) con el objetivo de identificar la transformación del sustrato y el comportamiento de la presión ejercida por el biogás a 48 h del ensayo de AHE, tiempo máximo de fermentación reportado por autores como (Pecorini et al., 2019) en la ejecución de este tipo de ensayos y, dentro del intervalo reportado por diferentes autores en el cual se alcanza la fase de presiones estables de biogás, evaluando el efecto de diferentes métodos de pretratamiento de inóculos sobre la producción de H₂ utilizando sustratos fácilmente biodegradables como la glucosa (Chang et al., 2011; Ren et al., 2008).

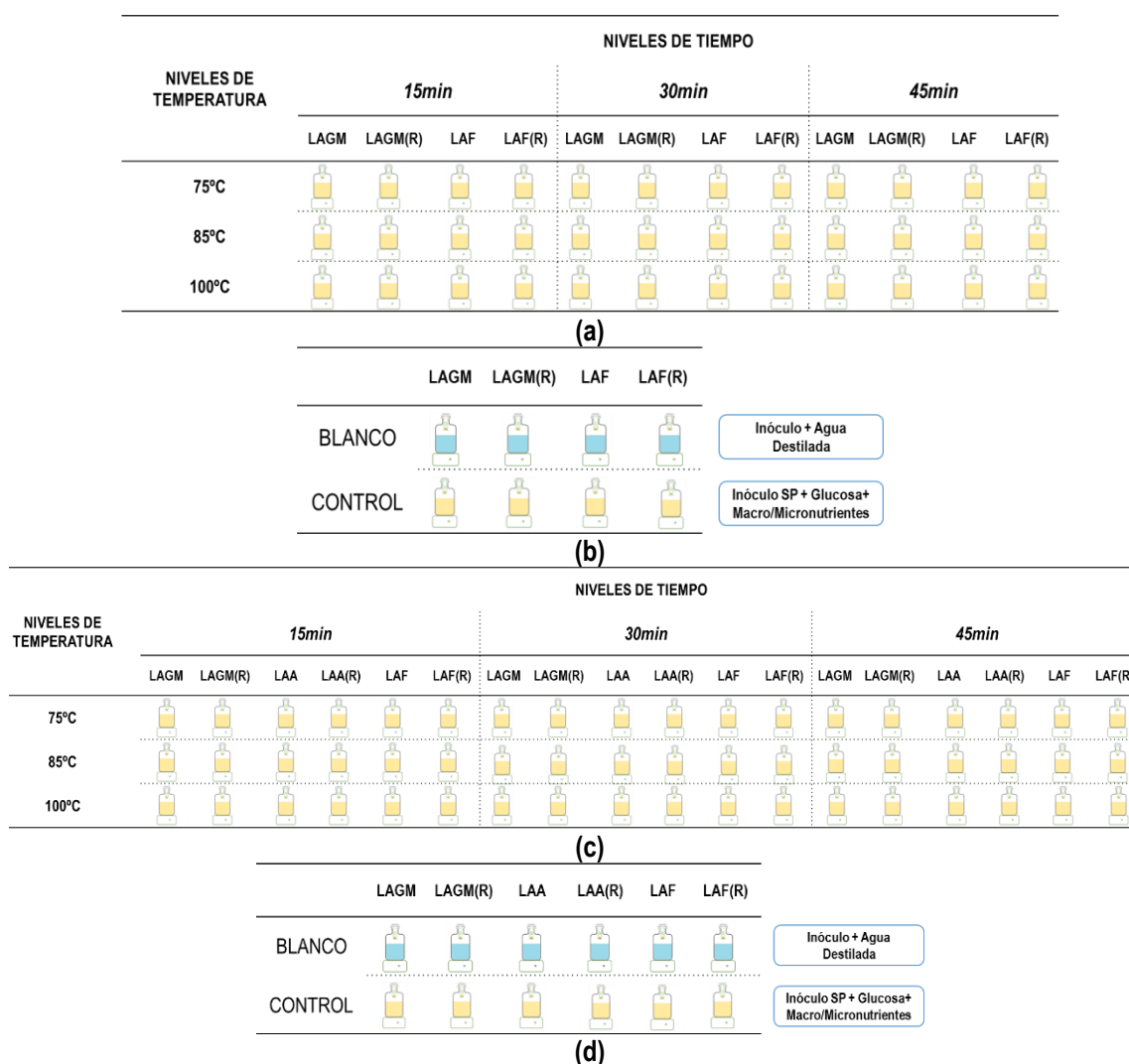


Figura 15. Configuración experimental de los ensayos de AHE: **(a) y (b)** Ensayo previo 2 Inóculos 48h + Reactores Control y Blanco; **(c) y (d)** Ensayos de AHE tres inóculos + Reactores Control y Blanco

*R= Replica, SP=Sin pretratamiento

4.1.4.2 Seguimiento y evaluación del efecto del pretratamiento térmico

El seguimiento de la producción de biogás en los ensayos de AHE, se realizó a través de la medición de la presión ejercida por éste, mediante un manómetro digital en intervalos de dos (2) horas. Así mismo, se tomaron muestras de biogás (5 mL) cuando la presión ejercida estuvo en su valor máximo y constante en el tiempo.

El volumen de gas extraído se almacenó en viales al vacío para su análisis por cromatografía. Para la fase líquida, se tomó muestra del sobrenadante de los reactores una vez finalizados los ensayos de AHE. La **Tabla 9** relaciona los parámetros fisicoquímicos caracterizados para la fase líquida y gaseosa y los métodos de análisis. La **Figura 16** muestra las actividades puntuales para el desarrollo de los ensayos de AHE desde la preparación del sustrato, hasta el seguimiento de la producción y toma de muestra de biogás.

Tabla 9. Parámetros fisicoquímicos caracterizados para la fase líquida y gaseosa, finalizado el ensayo de AHE

Objetivo de la Caracterización	Parámetro fisicoquímico	Unidades	Método/Técnica de medición	Fuente
Fase Líquida	DQO Total	mg.L ⁻¹	Digestión	APHA- et al. (2005)
	Carbohidratos Totales	mg.L ⁻¹	Fenól-Sulfúrico	Dubois et al. (1956)
	pH	Unidades	Potenciométrico	APHA- et al. (2005)
	Alcalinidad Total	mgCaCO ₃ .L ⁻¹	Titulación	APHA- et al. (2005)
	Alcalinidad Bicarbonática	mgCaCO ₃ .L ⁻¹	Titulación	APHA- et al. (2005)
	AGV's	meq.L ⁻¹	Titulación	Rojas (1999) y Penteado (2012)
Fase Gaseosa	H ₂	Fase I. Envío de muestras al laboratorio de cromatografía- Universidad de São Paulo- Brazil. Cromatógrafo GC. Gas de arrastre Argón.		
	CH ₄			
	CO ₂	Fase II. Envío de muestras al laboratorio de Calidad de Aguas- Universidad Militar Nueva Granada – Bogotá DC- Colombia. Cromatógrafo Agilent 7890 ^a . Gas de arrastre N ₂ .		

4.2 Fase II: Estimación de la producción potencial de H₂ en la FO del ARY

Esta Fase se desarrolló fundamentalmente a través de actividades similares a las ejecutadas en la Fase I, diferenciándose en el sustrato evaluado (ARY) y en el uso de un solo inóculo, correspondiente al de mayor AHE y rendimiento en la producción de H₂, seleccionado según la evaluación de dicha fase precedente.

La Fase II estuvo comprendida por las siguientes actividades: **a)** Recolección y Caracterización del ARY; **b)** Adaptación del inóculo al sustrato (ARY); **c)** Pretratamiento térmico del inóculo a la mejor combinación de T y t según la evaluación de la Fase I; **d)** Ensayo de producción de H₂ a través de la FO del ARY y, **e)** Seguimiento y estimación de la producción potencial de hidrógeno en la FO del ARY. Las anteriores actividades se describen a continuación:



Figura 16. Ensayo de AHE: (a) Inóculo Pretratado; (b) y (c) Preparación de solución de Macro/Micronutrientes; (d) Preparación de sustrato; (e) ajuste de pH Inóculo+Sustrato+ Macro/Micronutrientes; (f) y (g) adición de medio de reacción(Inóculo+Sustrato+ Macro/Micronutrientes) a los reactores, adición de perlas de NaOH y sellado hermético; (h) e (i) fermentación a 35°C; (j) medición de presión; (k) y (l) viales al vacío; (m) toma de muestra de biogás.

4.2.1 Recolección y caracterización de ARY

Se utilizó como sustrato agua residual generada en el proceso de extracción de almidón de yuca – ARY, reconocida como un sustrato potencial para la producción de H_2 a través de la FO (Cappelletti et al., 2011;

Madeira et al., 2017). El ARY se recolectó a la salida del canal de mancha de una rallandería de pequeña escala en el corregimiento de Mondomo, Municipio de Santander de Quilichao – Cauca (ver **Figura 17**).

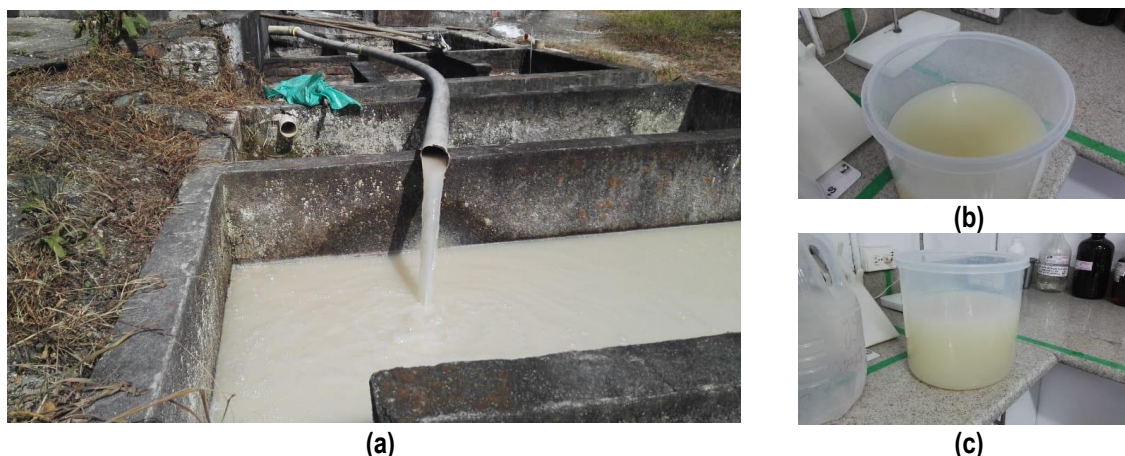


Figura 17. Agua residual generada en el proceso de extracción de almidón de yuca: (a) Punto de recolección (canal de la mancha); (b) y (c) Muestra en el laboratorio para ensayos de producción de H_2 a través de la FO.

Una vez recolectada, el ARY se almacenó bajo refrigeración ($<18^{\circ}C$ aprox.) hasta su uso (periodo de almacenamiento inferior a diez días) para las actividades de adaptación del inóculo y ensayos de FO; previo a la ejecución de estas últimas actividades, el ARY se caracterizó de acuerdo con los parámetros fisicoquímicos y métodos de análisis listados en la **Tabla 9** para la fase líquida (DQO Total, Carbohidratos Totales, pH, Alcalinidad Total, Alcalinidad Bicarbonática y AGV's).

4.2.2 Adaptación del inóculo con mayor AHE y rendimiento en la producción de H_2

El inóculo Lodo Anaerobio Acidogénico - LAA, al presentar mayor AHE y rendimiento en la producción de H_2 según la evaluación realizada en la Fase I, fue seleccionado para estimar la producción potencial de H_2 en la FO del ARY. En consecuencia, el inóculo mencionado fue adaptado al ARY, de tal manera que la comunidad microbiológica presente en él, asimilara el cambio de sustrato (sustrato con alto contenido de proteínas a un sustrato complejo con alto contenido de carbohidratos en forma soluble y particulada). Para lo anterior, se adoptó una estrategia de contacto o “alimentación” del inóculo con una variación porcentual del tipo de sustrato como se detalla en la **Tabla 10**, estrategia comúnmente usada en la adaptación al sustrato para inóculos anaerobios y anaerobios y que ha sido documentada por autores como (Barrios, 2015; Yela Larrahondo & Peña Castañeda, 2015) para el caso específico de adaptación de inóculos para el proceso de FO.

Tabla 10. Estrategia de adaptación al sustrato, para los ensayos de FO de ARY

Día	Variación porcentual (%ARSG /%ARY)
1	80/20
2	60/40
3	40/60
4	20/80
5	0/100

El criterio de decisión para el tránsito de una variación porcentual a otra, correspondió a la respuesta del inóculo en reducir el contenido de carbohidratos totales en un porcentaje igual o superior del 80%. Así mismo, se realizó

el seguimiento del pH del sobrenadante, como indicador del grado de acidificación del medio de reacción asociado a la conversión del sustrato (ARY) fácilmente acidificable a compuestos como AGVs. La adaptación del inóculo se realizó en un reactor tipo Batch con la misma configuración mostrada en la **Figura 12** para la actividad de adaptación realizada en la Fase I, manteniendo la proporción de Inóculo:Sustrato (60%:40%) y las condiciones de hermeticidad; el volumen de reacción fue inferior (1,25L) al requerirse una cantidad menor de inóculo a pretratar para el ensayos de FO del ARY.

4.2.3 Pretratamiento térmico del inóculo para ensayos de FO del ARY

El LAA adaptado al ARY se sometió a un pretratamiento térmico a una temperatura - T de 85°C y tiempo de exposición - t de 15min, combinación de T y t considerada como óptima para lograr el predominio de BPH de acuerdo con la Fase I del presente estudio.

Las actividades de laboratorio correspondientes al pretratamiento térmico del inóculo así como las actividades relacionadas (determinación previa de SST, SSV...), siguieron el mismo procedimiento aplicado en la Fase I, descrito en la **Figura 13**.

4.2.4 Ensayos de producción de H₂ a través de la FO del ARY

Para el inóculo adaptado al ARY y pretratado térmicamente, se realizaron ensayos de producción de H₂ a través de la FO del ARY bajo condiciones mesofílicas (35°C), mediante el seguimiento de la producción de biogás por el método manométrico. La unidad experimental para los ensayos de FO fue la misma que la utilizada en la Fase I (Ver **Figura 14**).

4.2.4.1 Sustrato y medio de reacción para los ensayos de producción de H₂ a través de la FO

Se garantizó una relación Sustrato:Inóculo (mgDQO_{ARY}.L⁻¹:mgSSV_{Lodo}.L⁻¹) de 2,0, valor que de acuerdo con el estudio de Yela & Peña (2015) puede favorecer una mayor producción de H₂ tratando agua residual agroindustrial como la ARY. El pH del medio de reacción fue ajustado a 5,40 ±0,05 mediante la adición de fosfato de Sodio (Na₂HPO₄), valor óptimo para la producción de H₂ cuando se utiliza ARY como sustrato según el estudio de (Barrios, 2015). Así mismo, de acuerdo con el marco referencial, el ARY contiene los requerimientos nutricionales necesarios para la producción de H₂ a través de la FO; en ese sentido, no se adicionaron al medio de reacción, aspecto que ha sido adoptado por estudios en el contexto local citados anteriormente para las condiciones de pH y relación Sustrato:Inóculo adoptadas.

Los ensayos de producción de H₂ a través de la FO del ARY se realizaron por duplicado e incluyeron reactores Control y Blanco a los cuales se les adicionó el inóculo sin pretratamiento térmico; para los primeros se mantuvo la relación Sustrato:Inóculo mientras que a los reactores Blanco no se les adicionó sustrato, aforándose entonces el volumen de reacción con agua destilada. Así mismo, se evaluó la AME del lodo Pretratado.

Debido a que en el ensayo inicial (ver **Figura 18a**) se observó un rápido decrecimiento de la presión ejercida por el biogás en las primeras horas del ensayo (aspecto que se detalla en el análisis de resultados), se realizó un ensayo confirmatorio (Ver **Figura 18b**) que tuvo como objetivo corroborar la producción de H₂ incluyendo reactores sin la adición de perlas de NaOH, de tal manera que permita contrastar el comportamiento de la presión ejercida por el biogás eliminando el decaimiento de la misma producto de la absorción del CO₂ generado.

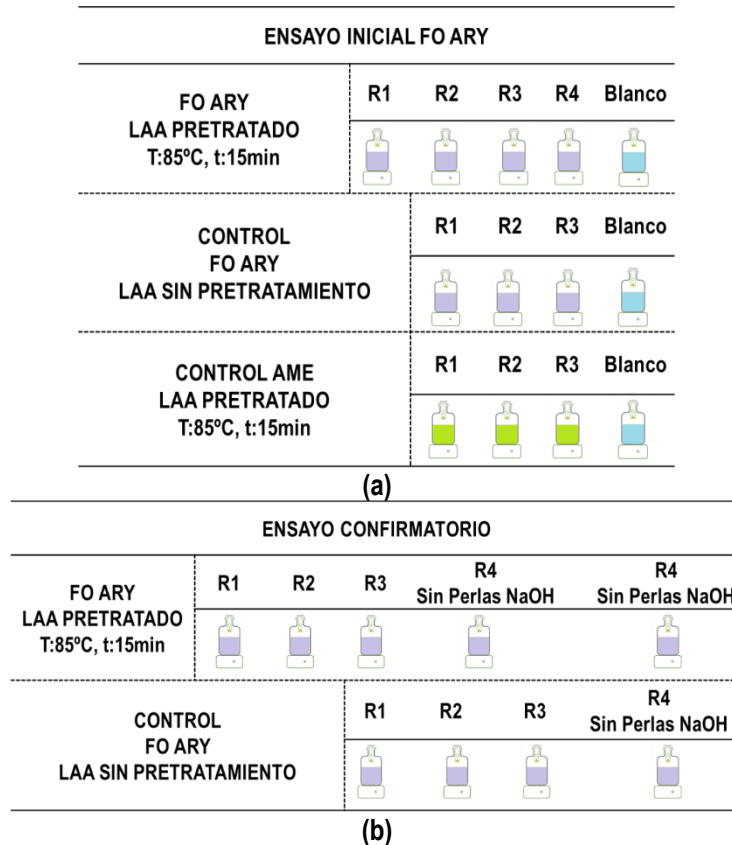


Figura 18. Configuración experimental de los ensayos de producción de H₂ a través de la FO del ARY: **(a)** Ensayo Inicial de producción de H₂ + Reactores Control y Blanco; **(b)**, Ensayo confirmatorio
*R=Réplica.

4.2.4.2 Seguimiento y estimación de la producción potencial de hidrógeno en la FO del ARY

El seguimiento y evaluación del efecto de pretratamiento térmico del inóculo sobre la FO del ARY se efectuó siguiendo el protocolo y los métodos de análisis descritos en la Fase I (ítem 4.1.4.2) para las siguientes subactividades:

- Medición de la presión ejercida por el biogás
- Muestreo y caracterización de la fase gaseosa
- Muestreo y caracterización de la fase líquida

4.3 Cálculos

El manejo de datos en la Fase I y II se realizó fundamentalmente sobre la estimación del volumen de H₂ producido, a partir del cual se relacionaron los parámetros fisicoquímicos medidos en la fase líquida (Ver **Tabla 9**). Para el almacenamiento, sistematización y salidas gráficas de los datos se usó el Paquete Office de Microsoft® (Excel, Word, Power Point). En primera instancia, se calcularon las moles de biogás generado en cada reactor de acuerdo con la **Ecuación 19**.

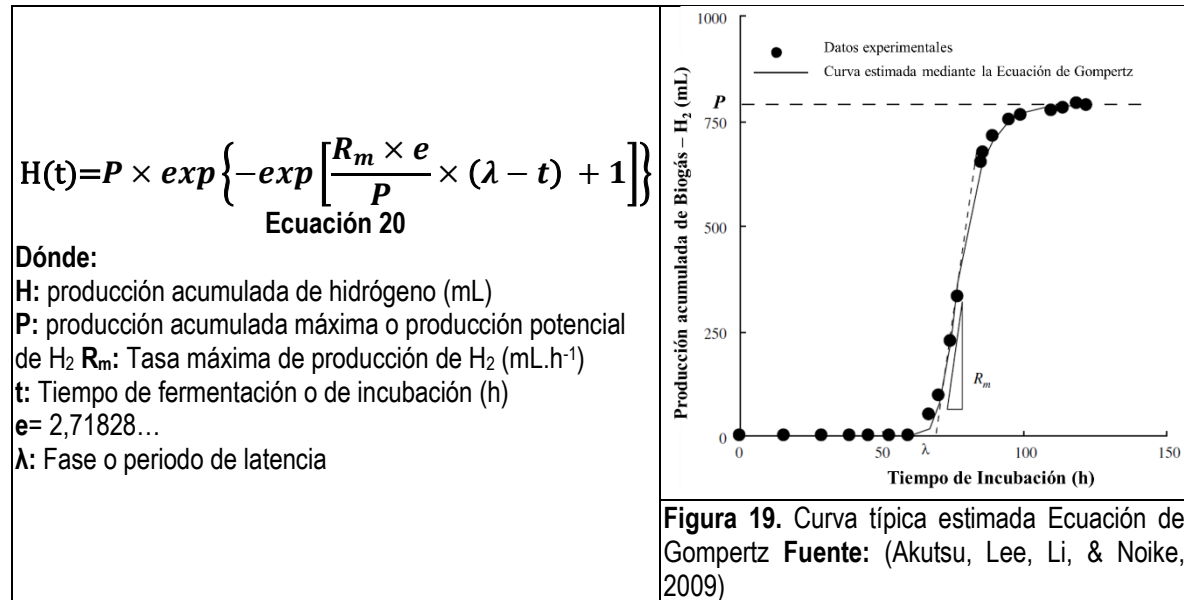
$$n = \frac{PV}{RT}$$

Ecuación 19

Donde: **P**: Presión acumulada en el reactor (atm); **V**: Volumen del Headspace en cada reactor (L); **n**: moles de biogás (mol); **R**: Constante de los gases ideales (0,08205746 atm.L.(mol.K)⁻¹; **T**: temperatura (K)

Una vez calculadas las moles de biogás, se determinó el volumen correspondiente, reordenando la **Ecuación 19** (Volumen como incógnita), bajo condiciones estándar ($P = 1 \text{ atm}$, $T = 298,15 \text{ K}$). Para el cálculo del volumen de H_2 en cada reactor, se multiplicó el volumen del biogás por la composición porcentual de H_2 según los análisis de cromatografía.

Para el cálculo del rendimiento en la producción de H_2 , se aplicó el modelo matemático de Gompertz modificado (ver **Ecuación 20** y **Figura 19**), modelo de tipo predictivo adecuado para describir el progreso acumulativo de producción de H_2 (Blanco Londoño & Rodríguez Chaparro, 2012). La determinación del coeficiente (R^2) fue usado como criterio para valorar el ajuste a través del Software OriginPro 9.0.



A partir del modelo de Gompertz, se determinó el rendimiento de hidrógeno en términos de DQO adicionada ($\text{mLH}_2 \cdot \text{gDQO}_{\text{adicionada}}^{-1}$) y Glucosa transformada ($\text{mLH}_2 \cdot \text{gGlucosa}_{\text{transformada}}^{-1}$) al final del ensayo (Tiempo de fermentación de 90h en la cual se observó la fase de presiones máximas y estables) según la **Ecuación 21** y la **Ecuación 22** respectivamente. La Actividad Hidrogénica Específica - AHE o tasa específica de producción de H_2 ($\text{mLH}_2 \cdot (\text{gSSV} \cdot \text{h})^{-1}$) se calculó mediante la **Ecuación 23**.

$$\text{Rendimiento de } \text{H}_2 = \frac{P}{\text{gDQO}_{\text{Adicionada}}} \quad \text{Ecuación 21}$$

$$\text{Rendimiento de } \text{H}_2 = \frac{P}{\text{gGlucosa}_{\text{Transformada}}} \quad \text{Ecuación 22}$$

$$\text{AHE} = \frac{R_m}{\text{gSSV}} \quad \text{Ecuación 23}$$

Para el cálculo de la Glucosa transformada, se utilizó la **Ecuación 24**:

$$\text{gGlucosa}_{\text{Transformada}} = \text{gGlucosa}_{\text{Adicionada}} - \text{gGlucosa}_{\text{Remanente}} \quad \text{Ecuación 24}$$

4.4 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de la Fase I, se empleó un diseño experimental completamente al azar, comparativo, prospectivo y longitudinal con los factores y niveles que se describen a continuación, utilizando como herramienta el Software Minitab®18:

- FASE I

FACTORES	Inóculo	NIVELES		
		LAGM	LAA	LAF
		75°C	85°C	100°C
		15min	30min	45min

Hipótesis nula: $H_0: \alpha\beta\gamma_{ijr} = 0$ → La variación del inóculo-temperatura y tiempo de exposición no influye en el rendimiento de producción de H_2

Hipótesis alterna: $H_0: \alpha\beta\gamma_{ijr} \neq 0$ → La variación del inóculo, temperatura y tiempo de exposición influye en el rendimiento de producción de H_2

Para la Fase II, se utilizó estadística descriptiva, mediante la cual se organizaron los datos a valores descriptivos como el promedio, mediana y demás, con el apoyo de tablas y gráficos.

4.4.1 Descripción del modelo estadístico Fase I:

Se realizó un análisis de varianza o ANOVA para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. Posteriormente, al presentarse diferencias significativas entre ellos, se aplicó una prueba Post-ANOVA por el método de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD), para determinar la mejor combinación de las variables cuantitativas de temperatura y tiempo de exposición y de la variable cualitativa inóculo. Se aceptaron diferencias significativas con $p < 0.05$. El diseño experimental tuvo una estructura factorial de acuerdo con los factores y Niveles (3^3) evaluando el efecto sobre la variable de respuesta rendimiento de H_2 ($\text{mLH}_2 \cdot \text{gGlucosa}^{-1}$) según la **Ecuación 25**:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_r + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ir} + (\beta\gamma)_{jr} + (\alpha\beta\gamma)_{ijr} + \varepsilon_{ijk}$$

Ecuación 25

Dónde: Y = Variable de respuesta; μ = Media general; α_i = Efecto del i -ésimo nivel del factor; $\alpha\beta\gamma_{ijr}$ = Efecto de la interacción entre factores; ε_{ijk} = Efecto del error experimental asociado

5 ANALISIS DE RESULTADOS

5.1 Evaluación del efecto del pretratamiento térmico sobre la AHE de tres inóculos

5.1.1 Características de los inóculos

La **Tabla 11** muestra las principales características cualitativas y cuantitativas de los tres inóculos utilizados en el presente estudio. Desde el punto de vista cualitativo, todos los inóculos tuvieron un olor y color característicos asociados con el AR de origen y cada uno de ellos tuvo una apariencia diferenciada, destacándose el LAGM por ser espeso y estar constituido además de gránulos bien definidos, de una fracción de biomasa dispersa (Ver **Figura 20**). Todos los inóculos al momento de su recolección presentaron burbujeo de biogás, característica asociada con su actividad biológica, la cual se mantuvo durante el tiempo de almacenamiento.

Tabla 11. Características cualitativas y cuantitativas de los inóculos utilizados

Parámetro		Inóculo		
		LAGM	LAF	LAA
Cualitativo	Olor	Fuerte, característico del AR del sacrificio de ganado	Moderado, característico del ARD y/o Municipal	Fuerte, característico al AR del sacrificio de ganado
	Color	Gris Oscuro	Negro	Café claro
	Apariencia	Espesa y heterogénea a simple vista. Biomasa con dos características: Composición granular bien definida de diferente tamaño y forma, además de una fracción importante de biomasa dispersa. Presenta burbujeo de biogás	Fluida y homogénea a simple vista. Biomasa de estructura floclulenta. Presenta burbujeo de biogás	Fluida y homogénea a simple vista. Biomasa de estructura floclulenta. Presenta burbujeo de biogás
Cuantitativo	pH (Unidades)	6,87	6,68	6,53
	SST (mg.L ⁻¹)	107.340	63.115	30.262
	SSV (mg.L ⁻¹)	84.799	33.451	25.202
	SSV/SST	0,79	0,53	0,83
	Tasa Máxima de Producción de CH ₄ (mLCH ₄ .d ⁻¹)*	152,0	4,8	18,8
	AME (gDQO.CH ₄ .(gSSV.d) ^{1**}	0,40	0,01	0,05

*Ajustada según el Modelo de Gompertz

**Con un factor de corrección (gDQO.LCH₄⁻¹) a Condiciones Normales de P (1atm) y T (25°C).

Los parámetros cuantitativos indican que el pH de los inóculos fue de 6,87, 6,68 y 6,53 para el LAGM, LAF y LAA respectivamente; el pH de este último es el más bajo, consistente con su origen (Reactor Acidogénico, en el cual predominan los procesos de hidrólisis y acidogénesis) (De Gioannis, Muntoni, Poletini, Pomi, & Spiga, 2017; Schievano, Tenca, Lonati, Manzini, & Adani, 2014). Para el LAGM y LAF, de acuerdo con su origen (Reactor UASB), presentaron un pH dentro del rango óptimo para el desarrollo de la DA completa (Hasta la

etapa de metanogénesis), considerado alrededor de 6,5 y 7,5 Unidades (Amani, Nosrati, & Sreekrishnan, 2010; Campos, 1999).

En cuanto a los SST, el LAGM tuvo una mayor concentración ($107.340 \text{ mg.L}^{-1}$), aspecto vinculado con su estructura granular mientras que el LAF y el LAA, debido a su estructura floculenta presentaron una concentración menor (631.15 mg.L^{-1} y 30.262 mg.L^{-1} respectivamente). El LAGM presentó una concentración de SSV de 84.799 mg.L^{-1} , lo cual representó una relación SSV/SST de 0,79, medida indirecta del contenido de una gran fracción de biomasa o microorganismos. Se resalta el hecho de que aunque el contenido de SST fue relativamente similar entre el LAF y LAA, para este último el 83% de los SST fueron volátiles, diferenciándose del LAF, cuyo valor porcentual fue de 53%, típico de inóculos provenientes del tratamiento de ARD (Torres et al., 2007).

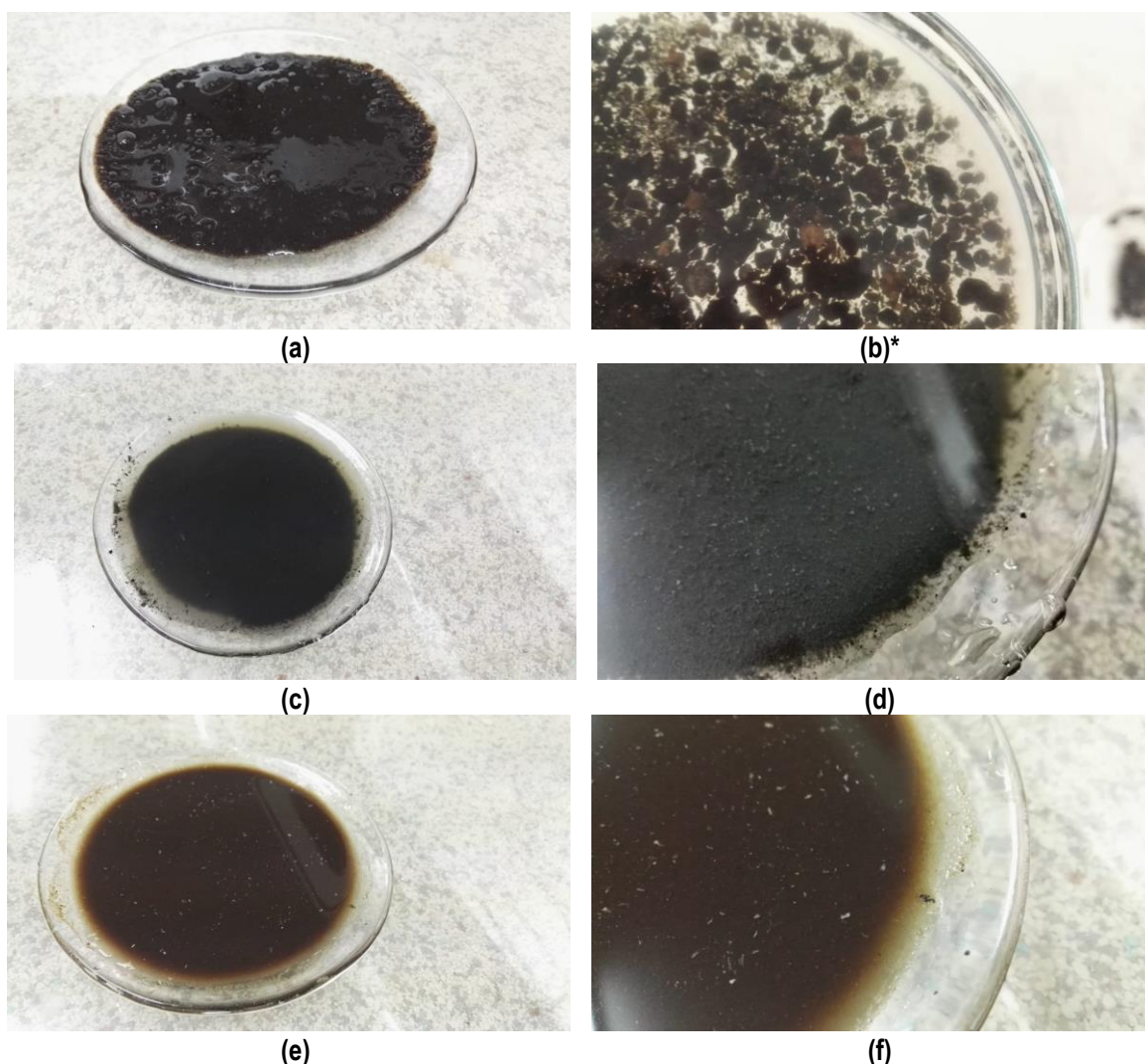


Figura 20. Apariencia de los Inóculos utilizados: (a) y (b) LAGM; (c) y (d) LAF; (e) y (f) LAA

*Apariencia luego de la adición de agua para diferenciación de los granulos

Aunque la concentración de SSV como medida indirecta del contenido de biomasa viable en los inóculos, pudo estar influenciada por el contenido de residuos u otros materiales en cada inóculo o cuantificar en cierta medida biomasa inactiva o “muerta” (Hussain & Dubey, 2017; Raposo et al., 2011), los ensayos de AME confirmaron la

alta actividad biológica del LAGM y del LAA frente al LAF, con valores de 0,40, 0,05 y 0,01 gDQO.CH₄.(gSSV.d)⁻¹ respectivamente.

La alta tasa de producción de CH₄ del LAGM (pendiente de la curva – ver **Figura 21**) y consecuentemente, la alta AME comparado con el LF y LAA se puede asociar a que contiene diferentes poblaciones microbiológicas bajo su estructura (gránulos), lo cual facilita las relaciones sintróficas e intercambio de metabolitos (Chernicharo, 2007; Y. Liu et al., 2003); este tipo de inóculos pueden presentar valores mínimos de AME de 0,3gDQO.CH₄.(gSSV.d)⁻¹ (Angelidaki et al., 2009) hasta valores de 2gDQO.CH₄.(gSSV.d)⁻¹ (Fernández, Abalos, Crombet, & Caballero, 2010). Además, de acuerdo con el protocolo del ensayo de AME utilizado en el presente estudio, se utilizó como sustrato una mezcla de AGV's con una proporción predominante de ácido acético (Aquino et al., 2007; Torres & Pérez, 2010) y en ese sentido, el LAGM presentó una AME cercana al valor mínimo reportado en la literatura para una AME acetoclástica (de 0,45 hasta 0,74g DQO-CH₄.(gSSV.d)⁻¹) (Gallegos - García, Celis, L & Razo - Flores, 2010; Hussain & Dubey, 2017), lo que es congruente ya que este tipo de inóculos (granulares) tienen una concentración de *arqueas* metanogénicas acetoclásticas mucho mayor que la de inóculos de tipo floculento (10⁹ y 10⁴ respectivamente), estos últimos en los cuales predominan las *arqueas* metanogénicas hidrogenotróficas (Torres et al., 2007).

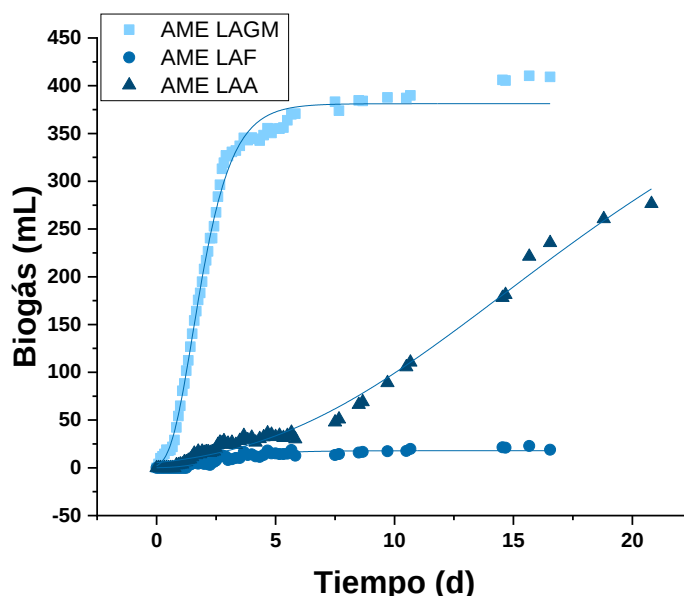


Figura 21. Curvas ensayos de AME de los inóculos seleccionados

Las características cualitativas y cuantitativas de los inóculos utilizados en el presente estudio, permiten puntualizar las siguientes consideraciones adicionales:

- El pH del LAA podría ser favorable en el desarrollo de los procesos de FO a escala real, en el cual se ha demostrado que las condiciones acidogénicas (por ejemplo valores de pH alrededor de 5) favorecen la producción de H₂ (Bharathiraja et al., 2016; S. Singh et al., 2015) y en ese sentido, las estrategias encaminadas a asegurar tales condiciones, serían menos intensivas en cuanto a la demanda de acondicionadores químicos.
- La baja concentración de SST del LAA podría considerarse como un aspecto desfavorable para el desarrollo de procesos de FO a escala real, al requerir mayores volúmenes de inoculación; no obstante, su alta proporción de SSV podría minimizar en cierta medida, ese aspecto limitante.
- El contenido de SST y SSV del LAGM, además de su AME lo categorizan como un inóculo con alta concentración de biomasa activa y buenas características de sedimentabilidad (inferida a través de su

estructura granular predominante). De mantenerse estos atributos en el inóculo en los procesos de FO a escala real, podrían garantizar alta resistencia al efecto de lavado o pérdida en el efluente y la operación de reactores a altas cargas orgánicas en reactores más compactos.

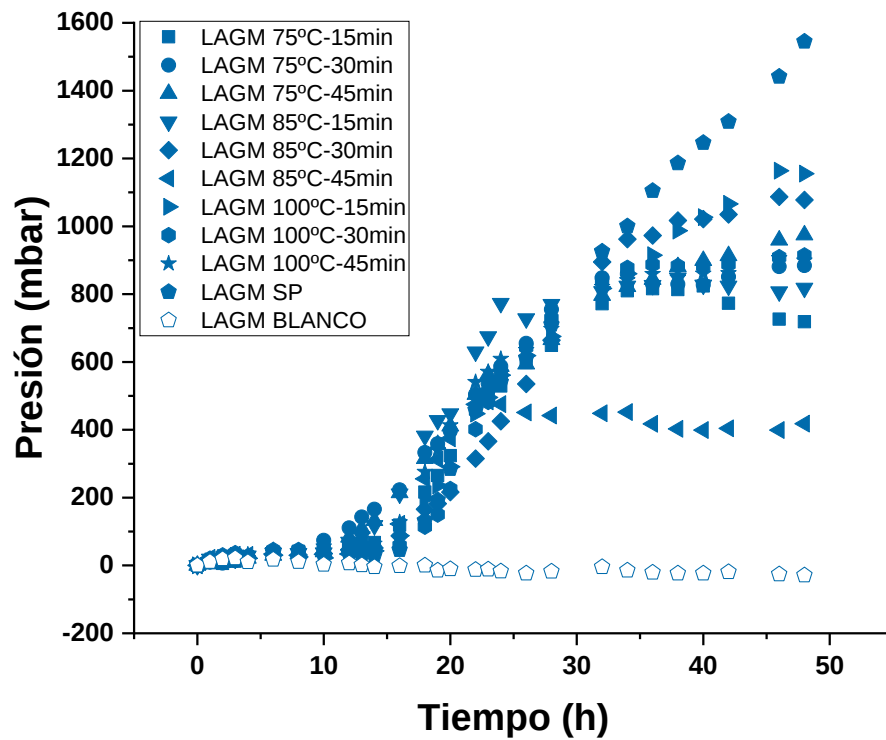
- Valores de AME alrededor de $0,04 \text{gDQO} \cdot \text{CH}_4 \cdot (\text{gSSV} \cdot \text{d})^{-1}$ como los registrados por el LAF y LAA los categorizan como inóculos de pobre calidad en procesos de DA (Hussain & Dubey, 2017); no obstante, esta variable per se, no es un criterio decisorio para la selección de inóculos en la FO, pues los inóculos de tipo floculento como los provenientes de PTAR doméstica y/o municipal o biodigestores han demostrado su factibilidad en la producción de H_2 ya que contienen BPH (De Sá et al., 2013; Pendyala et al., 2012), así mismo, el LAA puede garantizar la presencia de BPH adaptadas a las condiciones específicas de pH, temperatura, TRH, carga orgánica y demás necesarias para la hidrólisis y acidogénesis de un sustrato complejo y consecuentemente, para la producción de H_2 (Massanet-Nicolau et al., 2015; Schievano et al., 2014).

5.1.2 Ensayo previo de AHE a 48H de Fermentación

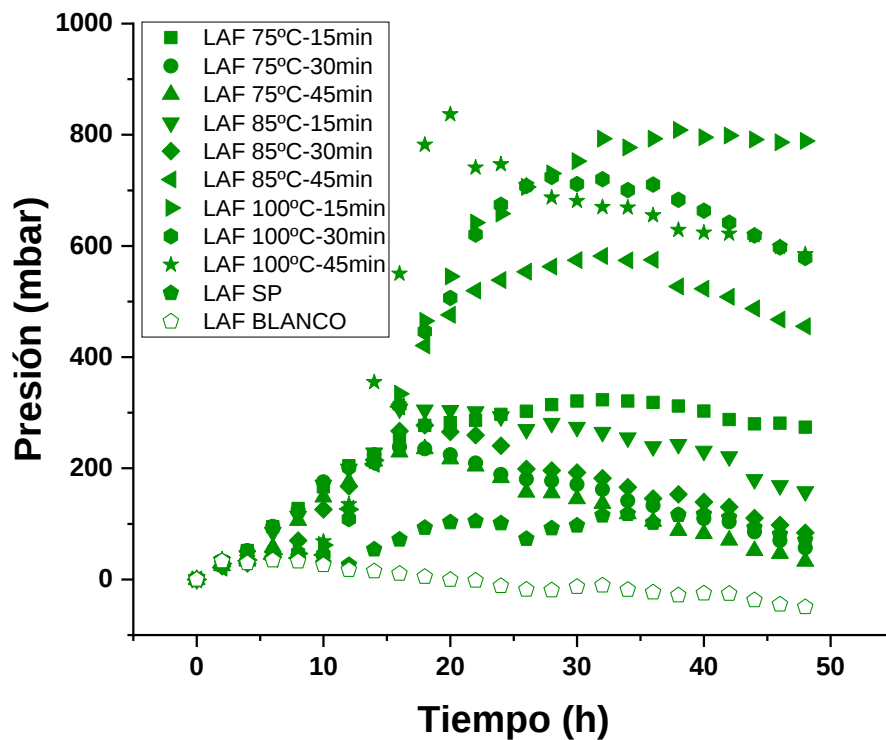
La **Figura 22** muestra el promedio de la presión ejercida por el biogás en los ensayos de AHE efectuados para cada inóculo adaptado a glucosa (LAGM y LAF) según el pretratamiento térmico aplicado durante un tiempo de fermentación de 48h. El comportamiento de la presión ejercida por el biogás a la temperatura del ensayo (35°C) indica una mayor escala para el caso del LAGM (presiones hasta del orden de los 1600 mbar) respecto a las del LAF (del orden de 850 mbar). Así mismo, se hace evidente una menor variabilidad en las fases de latencia y crecimiento exponencial para cada pretratamiento térmico evaluado en el LAGM.

Para el caso del LAGM, la fase de crecimiento exponencial de la presión ejercida por el biogás, inició aproximadamente a las 15 h de fermentación y mostro tendencia creciente hasta las 30 y 35 h aproximadamente dependiendo del pretratamiento, tiempo en el cual se observó la fase de presiones estables o con mínima pendiente. Lo anterior, exceptuando tres casos; el primero corresponde al comportamiento de la presión ejercida por el biogás del LAGM sin pretratamiento (LAGM SP en la **Figura 22a**) en la cual la fase exponencial continuó durante el tiempo de fermentación, el segundo caso hace referencia al pretratamiento térmico a 85°C – 45 min en la cual se observó la ocurrencia temprana de la fase de presiones estables (24h aproximadamente) y el tercero corresponde al LAGM sin la adición de sustrato (LAGM Blanco en la **Figura 22a**), en el cual como es de esperarse no hubo producción de biogás, y las presiones fueron negativas. De esta manera, la presión ejercida por el biogás en el LAGM para las condiciones de pretratamiento evaluadas, denotan la existencia de una fase inicial de adaptación de los microorganismos a las condiciones del ensayo (primeras 15h), seguida de una etapa de asimilación del sustrato con la consecuente producción de biogás a diferentes tasas de producción pero similares entre si, hasta llegar a una fase de presiones estables para la mayoría de los casos, lo cual sugiere su correlación con la fase líquida para verificar las condiciones de agotamiento/reducción del sustrato.

Para el caso del LAF, cada pretratamiento térmico evidenció una tendencia particular en la presión ejercida por el biogás, destacándose el hecho que al finalizar el tiempo de fermentación, se observó un decrecimiento de esta variable. Así mismo, contrario a lo evidenciado para el LAGM, el LAF sin pretratamiento (LAF SP en la **Figura 22b**) se caracterizó por presentar las presiones más bajas de biogás (en su punto de producción máxima). Coincidente con el LAGM, el LAF sin sustrato (LAF Blanco) no produjo biogás, presentando presiones negativas; este aspecto para los dos inóculos evaluados se puede asociar con la asimilación por parte de los microorganismos de los gases remanentes (provenientes del aire) en el Headspace (volumen libre o de almacenamiento de la fase gaseosa) del reactor después de su sellado, por ejemplo, debido al consumo de trazas de O_2 por parte de bacterias facultativas (Henze et al., 2008; Krzysztof Ziemiński, 2012), además, la inclusión de perlas de NaOH, pudieron absorber el CO_2 remanente en la fase gaseosa (Pirc, Novosel, & Bukovec, 2012). De otro lado, las presiones negativas en los reactores “blanco” para el LAGM y LAF, sugieren que los procesos metabólicos endógenos que pudiesen haber ocurrido ante el déficit de sustrato, fueron nulos o mínimos.



(a)



(b)

Figura 22. Presión ejercida por el biogás para cada pretratamiento térmico del LAGM y LAF, durante un tiempo de fermentación de 48h. (a) LAGM, (b) LAF

El punto máximo de presión ejercida por el biogás para el LAGM pretratado durante el tiempo de fermentación, correspondió al pretratamiento 100°C-15min (1164mbar a las 46h de fermentación) equivalente a una producción máxima estimada de biogás de 277,9 mL a condiciones normales de presión y temperatura (1atm y 25°C respectivamente). No obstante, la producción máxima cuantificada para este pretratamiento (100°C-15min) no superó la producción máxima del LAGM SP, cuya presión máxima fue de 1545 mbar a las 48h de fermentación equivalente a 368,8 mL de biogás. Para el LAF, el punto máximo de presión ejercida por el biogás durante el tiempo de fermentación, correspondió al pretratamiento de 100°C-45min (837mbar a las 20h de fermentación) equivalente a una producción máxima estimada de biogás de 199,8 mL, el cual fue mayor que la presión ejercida por el biogás cuando no se efectuó pretratamiento, este último correspondiente a una presión máxima de 118mbar a las 34h de fermentación, equivalente a un volumen estimado de biogás de 28,2mL.

El comportamiento de la presión ejercida por el biogás para los inóculos estudiados, permite inferir preliminarmente según el tiempo de fermentación evaluado, que el LAGM presenta mayor producción de biogás que el LAF, aún sin someterse a un pretratamiento térmico. Así mismo, sugiere considerar aspectos de gran importancia como el hecho que para el LF, las presiones ejercidas por el biogás una vez alcanzan un punto máximo, tienden a decrecer (exceptuando el pretratamiento 100°C-15min), condición bien definida para el pretratamiento con mayor producción máxima de biogás para este inóculo (100°C-45min).

Las consideraciones anteriores relacionadas con la presión ejercida por el biogás y la estimación volumétrica durante el tiempo de fermentación para el LAGM y LAF, se relacionaron con la composición del mismo. La **Figura 23** muestra la composición del biogás para los inóculos estudiados, constituido por H_2 y CO_2 principalmente, en concordancia con diferentes estudios de FO utilizando sustratos de fácil asimilación y afines a las BPH como la glucosa (Baghchehsaraee et al., 2008; Fang & Liu, 2002; Logan et al., 2002). Para el caso del LAGM, los valores porcentuales de H_2 y CO_2 fueron de 58,8 - 100% y 0,0 - 41,2% respectivamente, mientras que para el caso del LAF estos valores fueron de 23,8 - 65,7% y 38,4-74,7% en su orden.

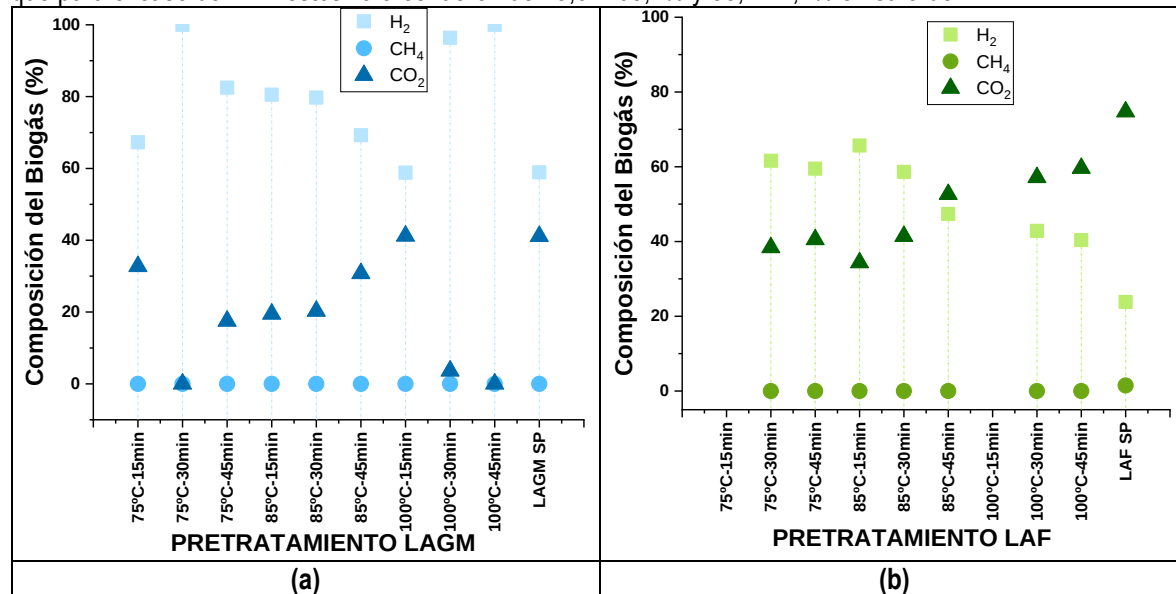


Figura 23. Composición del biogás para cada pretratamiento térmico del LAGM y LAF. (a) LAGM, (b) LAF

Notas:

- Las muestras de biogás correspondieron a puntos de presiones crecientes o máximas
- Las muestras de biogás arrojaron presencia de N_2 , sin embargo fueron eliminadas del cálculo porcentual, ya que de acuerdo con el tipo de ensayo ejecutado y las presiones ejercidas por el biogás al momento de tomar la muestra, no es significativa la cantidad esperada de este biogás. La presencia de N_2 en las muestras se asoció con posibles errores experimentales en la inyección y/o extracción del biogás al vial (ingreso de N_2 atmosférico) o contaminación del vial
- No fue posible obtener la composición de las muestras para LAF 75°C-15min y LAF 100°C-15min

Solo fue detectado metano en una fracción mínima para el caso del LF, sin pretratamiento (1,2%). Lo anterior indica por un lado la efectividad del pretratamiento térmico en la inhibición de microorganismos consumidores de H_2 como las *arqueas* metanogénicas y por el otro, que esa efectividad, pudo estar fortalecida en cierta medida por el tipo de sustrato utilizado, el cual es fácilmente biodegradable y afín a las rutas metabólicas específicas de producción de H_2 , CO_2 y AGVs.

La composición del biogás permite inferir que durante el tiempo de fermentación en el que se presentaron las presiones crecientes o máximas, el biogás producido por el LAF tuvo menor contenido de H_2 que el LAGM, destacándose el hecho que el LAF sin pretratamiento presenta el menor contenido de este biogás y mayor contenido porcentual de CO_2 (74,7%). Lo anterior confirma que el pretratamiento térmico puede influir en la producción de H_2 para este tipo de lodo, situación que difiere del LAGM, en el cual si bien el pretratamiento térmico permitió mayor composición porcentual de H_2 (por ejemplo 75°C-30 min y 100°C-45 min donde fue del 100%) respecto a la condición sin pretratamiento (58,9% de H_2), la presión ejercida por este último cuantifica una producción similar (y ligeramente mayor) de H_2 en términos de volumen, como se muestra en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Composición porcentual del biogás generado y estimación del volumen generado

PRETRATAMIENTO TERMICO	LAGM					LAF				
	Composición del Biogás (%)			$H_{m\acute{a}x}$ (mLBiogás)	$H_{m\acute{a}x}$ (mLH ₂)	Composición del Biogás (%)			$H_{m\acute{a}x}$ (mLBiogás)	$H_{m\acute{a}x}$ (mLH ₂)
	H ₂	CH ₄	CO ₂			H ₂	CH ₄	CO ₂		
75°C-15min	67,3	0,0	32,7	196,7	132,3	ND			77,1	ND
75°C-30min	100,0	0,0	0,0	211,0	211,0	61,6	0,0	38,4	56,8	35,0
75°C-45min	82,5	0,0	17,5	232,6	191,9	59,5	0,0	40,5	56,1	33,4
85°C-15min	80,5	0,0	19,5	202,4	163,0	65,7	0,0	34,3	73,3	48,1
85°C-30min	79,7	0,0	20,3	259,5	206,9	58,6	0,0	41,4	66,2	38,8
85°C-45min	69,2	0,0	30,8	115,4	79,9	47,4	0,0	52,6	138,9	65,8
100°C-15min	58,8	0,0	41,2	277,9	163,5	ND			193,0	ND
100°C-30min	96,4	0,0	3,6	218,2	210,3	42,9	0,0	57,1	172,8	74,1
100°C-45min	100,0	0,0	0,0	216,3	216,3	40,4	0,0	59,6	199,8	80,7
SP	58,9	0,0	41,1	368,8	217,2	23,8	1,5	74,7	28,2	6,7

De acuerdo con la **Tabla 12**, la máxima producción de H_2 para el LAGM se obtuvo con la condición SP (217,2mL), ligeramente mayor que la condición de pretratamiento a 100°C-45min (216,3mL) y 100°C-30min (163,5mL). Para el caso del LAF y según los datos disponibles, la mayor producción de H_2 correspondió al pretratamiento de 100°C-45min con un valor estimado de 80,7mL. Los menores volúmenes de producción estimada de H_2 , se encontraron para el caso del LAGM en el pretratamiento 85°C-45min (79,9mL) y para el caso del LAF, bajo la condición SP (6,7%), asociado tanto a la composición del biogás, a la presión ejercida por el mismo y al contenido de CH_4 , como se mencionó anteriormente.

Respecto a las características de la fase líquida, la **Figura 24** muestra el porcentaje de Reducción de DQO y Carbohidratos para cada pretratamiento térmico del LAGM y LAF. Para los dos inóculos, la reducción de DQO no sobrepasó el 26%, siendo consistente con el proceso de FO, en la cual los metabolitos generados como los AGVs aportan a esta variable (Antonopoulou, Gavala, Skiadas, Angelopoulos, & Lyberatos, 2007b). En cuanto a la reducción de carbohidratos, el LAGM presentó valores porcentuales entre 33 y 71%, correspondiendo los valores límites a los pretratamientos 85°C-45min y SP respectivamente. Para el LAF, se presentaron

porcentajes de reducción de carbohidratos entre 12 y 78%, correspondiendo estos valores límites a los pretratamientos 75°C - 30 y 45min y 100°C-15min respectivamente. Se resalta el hecho que para algunos pretratamientos evaluados, principalmente en el caso del LF, una menor reducción de carbohidratos estuvo asociada con una menor producción máxima de H_2 (como es el caso de los pretratamientos a 75°C ver **Figura 24b**), aspecto que en cierta medida también se observó en el LAGM para el caso del pretratamiento a 85°C-45min (ver **Figura 24a**).

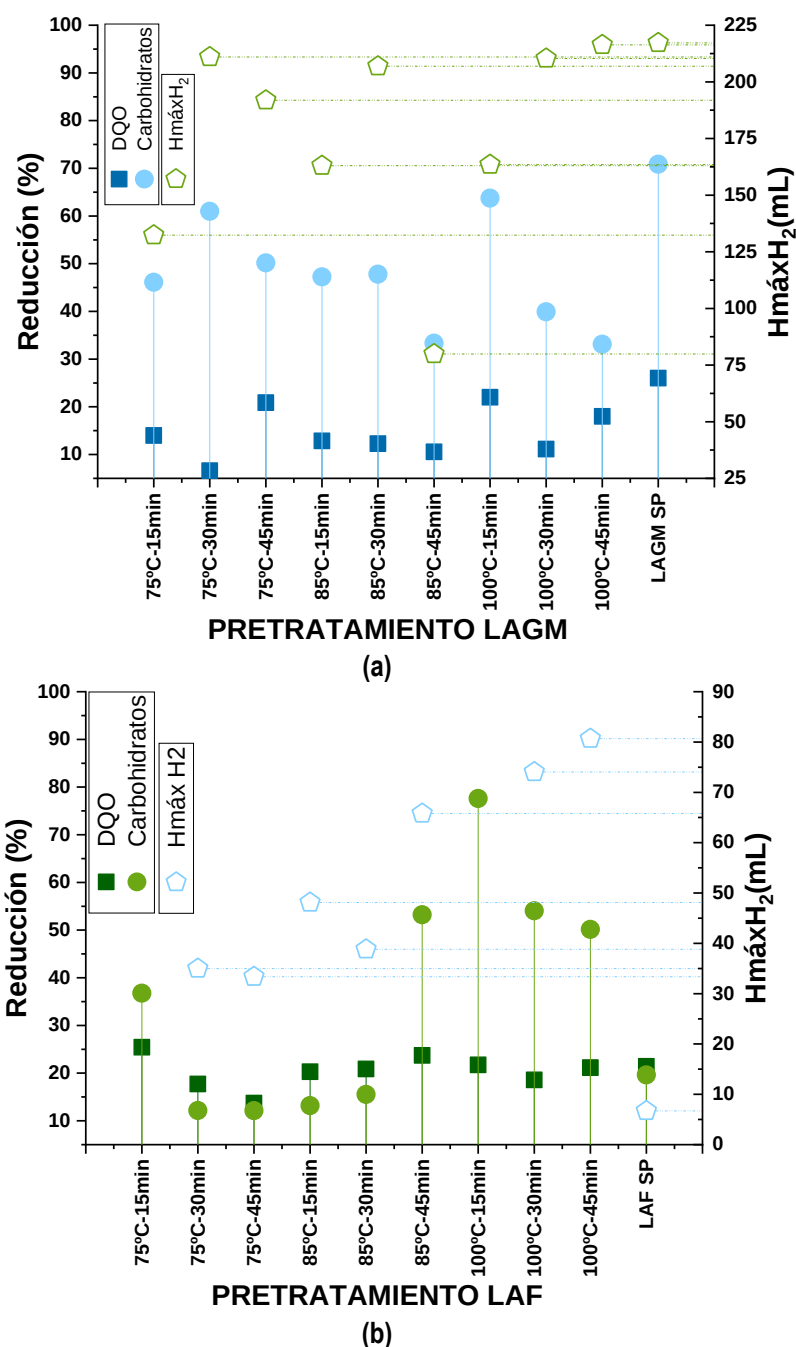


Figura 24. Porcentaje de Reducción de DQO, Carbohidratos y HmáxH₂ para cada pretratamiento térmico del LAGM y LAF, finalizado el tiempo de fermentación de 48h. (a) LAGM, (b) LAF

El pH de la fase líquida finalizado el tiempo de fermentación (48h) como se muestra en la **Figura 25**, estuvo comprendido entre 4,11 y 4,36 Unidades para el caso del LAGM, indicando la acidificación del medio y la ausencia de alcalinidad bicarbonática. La alcalinidad total cuantificada para los pretratamientos con pH alrededor de 4,3 Unidades fue mínima (menor a $4\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$) y pudo estar asociada a la capacidad buffer no útil de los AGVs presentes en el medio (Rojas Chacón, 1987; Cajigas, Pérez, & Torres, 2005). El pH del LAF al finalizar el ensayo varió entre 3,8 y 4,2 Unidades, valores más bajos que los encontrados en el LAGM.

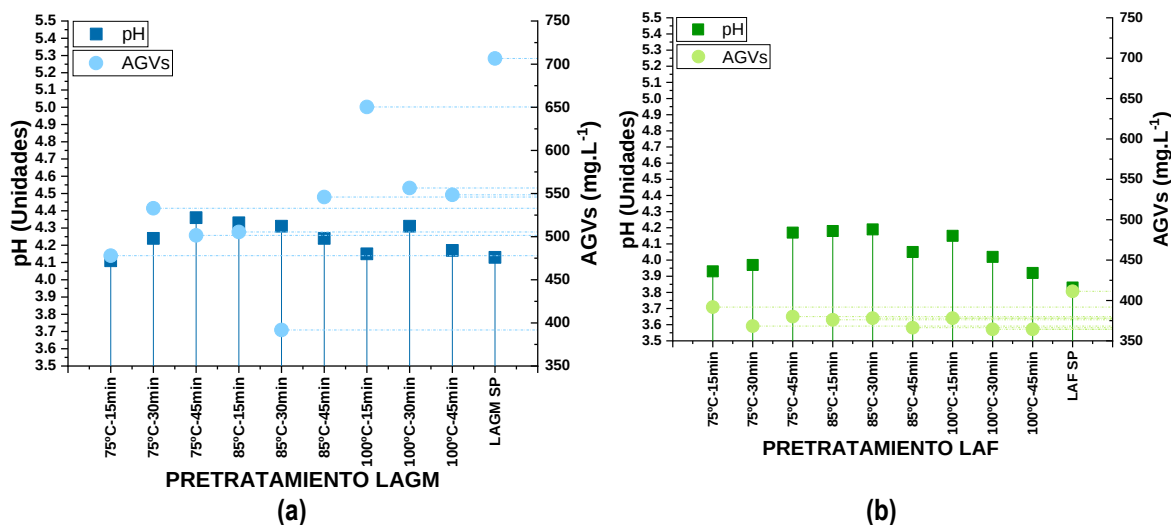


Figura 25. pH y concentración de AGVs para cada pretratamiento térmico del LAGM y LAF, finalizado el tiempo de fermentación de 48h. **(a)** LAGM, **(b)** LAF

Teniendo en cuenta que la producción de AGVs en la FO está relacionada directamente con el consumo de alcalinidad y la consecuente caída del pH del medio de reacción (Davila-Vazquez, de León-Rodríguez, Alatríste-Mondragón, & Razo-Flores, 2011; Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009), este factor no fue ajeno para las condiciones finales de la fase líquida en el LAGM y LAF para los diferentes pretratamientos evaluados. El decrecimiento más pronunciado del pH para el LF pudo estar asociado con factores adicionales, si se tiene en cuenta que la producción de AGVs fue menor para este inóculo (los cuales tuvieron una concentración entre 364 y $411\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ frente a los 392 y $707\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para el LAGM – Ver **Figura 25**). En consecuencia, la mayor acidificación del medio de reacción al finalizar el tiempo de fermentación para el LAF, se atribuye a la producción simultánea de CO_2 en rutas específicas de producción de AGVs (como el butirato y acetato) e H_2 , “coproducción” más acentuada en el LAF según la caracterización de la fase gaseosa, y que sugiere su presencia en la fase líquida en suficiente concentración para incidir en el sistema carbonato del medio de reacción.

La asociación de las características de la fase gaseosa (presión, volumen y composición estimada) con los de la fase líquida (reducción de sustrato, producción estimada de AGVs, pH y alcalinidad) permite considerar los siguientes enfoques respecto al efecto del pretratamiento térmico sobre la AHE de los inóculos LAGM y LAF durante un tiempo de fermentación de 48 h:

- La reducción porcentual del sustrato (Glucosa) tanto para el LAGM (Hasta un 71%) como para el LAF (Hasta un 78%) fue inferior a las reportadas bajo condiciones similares al ensayo previo (AHE₄₈) del presente estudio. Por ejemplo, (Chang et al., 2011) evaluando el efecto del pretratamiento térmico de un inóculo a 95°C -30min utilizando glucosa como sustrato ($10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), reportaron reducciones del sustrato del orden del 92% en un tiempo de fermentación de 42 h. Resultados similares fueron reportados por (J. Wang & Wan, 2008a) quienes pre trataron un inóculo a 100°C -15min y obtuvieron a las 36 h de fermentación, una reducción del sustrato de 97,2%. Los dos autores reportaron la aparición de presiones estables del biogás generado al final del ensayo.

- Para el caso del LAGM, la condición SP registró producción de H_2 y fue ligeramente superior a la reportada para los pretratamientos con mayor producción de este biogás ($100^\circ C$ a 45min y 30min). Lo anterior puede ser explicado en primera instancia, por el hecho que la estructura granular del inóculo pudo favorecer las relaciones sintróficas de microorganismos y asegurar en cierta manera la presencia de microorganismos productores de hidrógeno - BPH (Abreu et al., 2010; Alibardi et al., 2012; B. Hu & Chen, 2007). Así mismo, el LAGM fue adaptado a un sustrato de fácil degradación (Glucosa), reconocido por su afinidad con las BPH (Lopez-Hidalgo et al., 2018; Łukajtis et al., 2018). De otro lado, el decrecimiento del pH (4,11 y 4,36 Unidades) fuera del límite óptimo para la supervivencia de las arqueas metanogénicas (6,5 y 7,5 Unidades), pudo favorecer que éstas se inhibieran durante el tiempo de fermentación (Baghchehsaraee et al., 2008). Esta situación también ha sido reportada en diferentes estudios encaminados a evaluar el efecto de diferentes tipos de pretratamiento, utilizando inóculos de tipo granular (Luo, Xie, Zou, Wang, & Zhou, 2010) y otros tipos de inóculos anaerobios (Kawagoshi et al., 2005).
- La condición SP del LAGM también expuso una situación particular de importancia, y radica en que la correspondiente curva de presión ejercida por el biogás, si bien permitió estimar una producción máxima, no evidenció una fase estable o de tasa de producción mínima dentro del tiempo de fermentación. Esta situación también ha sido reportada por autores como (Kawagoshi et al., 2005), quienes evaluando el efecto de diferentes tipos de pretratamiento sobre la AHE de seis inóculos utilizando glucosa como sustrato, la producción de H_2 de uno de los inóculos estudiados (sedimento) continuó en una fase creciente hasta la finalización del ensayo (45h). Lo anterior, sumado al hecho de que la reducción de carbohidratos al final del ensayo para el LAGM SP fue del 71%, genera incertidumbre respecto a la producción potencial máxima de H_2 , en caso de lograrse mayores porcentajes de reducción (80 - 90% reportado en diferentes estudios utilizando como sustrato compuestos fácilmente degradables como la glucosa) bajo un tiempo de fermentación superior a 48 h.

De esta manera, si bien los ensayos de AHE se conciben como una herramienta rápida y práctica para la determinación de la tasa de producción de H_2 para un inóculo y otros factores del proceso de FO (utilizando sustratos fácilmente degradables como la glucosa), donde se han propuesto y/o desarrollado periodos de fermentación cortos del orden de 20 y 24 h (Tanisho, 2002; Trevisan et al., 2015) e intermedios de alrededor de 36 y 48h (Chang et al., 2011; Pecorini et al., 2019; Ren et al., 2008; J. Wang & Wan, 2008a), las características propias del inóculo como el caso del LAGM, la relación Sustrato/Inóculo y demás condiciones de operación como el pH y la temperatura podrían sugerir tiempos de fermentación más extensos, del orden de 100 y 150 h o más (Baghchehsaraee et al., 2008; Elbeshbishy et al., 2011; Logan et al., 2002).

- De acuerdo con lo anterior y con lo obtenido en el ensayo previo de AHE, se considera pertinente evaluar la AHE del LAGM bajo un tiempo mayor de fermentación (>48h). Así mismo, esta consideración también aplica para el LF debido a que se hace necesario establecer si el decrecimiento de la presión ejercida por el biogás una vez alcanza su punto máximo, obedece a la dinámica de absorción de CO_2 por parte del NaOH acoplado a cada reactor (ver metodología), en la cual la presunta alta tasa de producción de este biogás en las primeras horas del ensayo pudo superar la tasa de absorción del mismo; bajo este escenario, es de esperarse que un tiempo de fermentación mayor permitirá cuantificar de una mejor manera la producción de H_2 una vez absorbida la gran cantidad de CO_2 inicial. Adicionalmente, un tiempo superior de fermentación para el LAF, permitirá identificar de manera indirecta otros factores que pudiesen haber incidido en el decrecimiento de la presión del biogás, como es el caso de la posible asimilación del H_2 producido por las bacterias homoacetogénicas.

- El ensayo previo de AHE reportó para cada inóculo un comportamiento particular de la presión ejercida por el biogás (y consecuentemente, del volumen producido) para cada pretratamiento en las fases de latencia, exponencial y estacionaria, siendo más variable para el caso del LAF. En ese sentido, el ajuste de las curvas (de presión o de volumen) a través de un modelo predictivo como el de Gompertz modificado, constituyen una estrategia adecuada para describir el progreso acumulativo de producción de H_2 (Blanco Londoño & Rodríguez Chaparro, 2012), para ser aplicado en los ensayos de AHE en un tiempo de fermentación mayor a 48h.

5.1.3 Efecto del pretratamiento térmico sobre la AHE de tres inóculos

5.1.3.1 Comportamiento de la presión ejercida por el biogás

De acuerdo con lo encontrado en el ensayo previo (48h de fermentación), se evaluó el efecto pretratamiento térmico sobre la AHE de tres inóculos (LAGM, LAF y LAA) bajo un tiempo de 92 h, el cual se encuentra dentro del rango establecido por diferentes estudios relacionados (Baghchehsaraee et al., 2008) y de estudios que demuestran la factibilidad de cuantificar como H_2 la totalidad del biogás generado cuando se adiciona un absorbente de CO_2 , y cuando se utiliza un sustrato fácilmente biodegradable y afín a las BPH como la glucosa (Logan et al., 2002). Así mismo, el tiempo de fermentación fue menor a 100 h, valor considerado en el contexto local para el LAGM, en el cual pueden iniciarse procesos de consumo de H_2 por parte de arqueas metanogénicas hidrogenotróficas (que pudiesen no ser inhibidas completamente con el pretratamiento térmico) (Barrios, 2015). Los aspectos mencionados anteriormente, permitieron definir al biogás generado como **Biogás* H_2** , como se detallará más adelante en el análisis cinético (**capítulo 5.1.3.2**).

La **Figura 26** muestra la presión ejercida por el biogás en la AHE del LAGM a las diferentes magnitudes de T y t según el pretratamiento térmico evaluado (representados por R1 y R2 en las figuras mencionadas de acuerdo con el duplicado), en el cual fueron evidentes las fases de latencia, crecimiento exponencial y fase estacionaria de producción de biogás. Así mismo, se muestra la curva de presiones asociada con el LAGM SP.

En primera instancia, se observó que algunos pretratamientos evaluados (por ejemplo 75°C-15min, 85°C-45min y 100°C-15min) presentaron una “primera fase estacionaria” de producción de biogás, en un tiempo de fermentación entre 40 y 50 h, lo cual corroboró la pertinencia de evaluar un periodo más extenso de fermentación (92h frente a las 48h del ensayo previo), de acuerdo con las condiciones operacionales propias del ensayo como la relación sustrato/microorganismos. Así mismo, conforme a lo evidenciado en el ensayo previo, los reactores Blanco no evidenciaron producción de biogás, registrando presiones negativas durante el tiempo de fermentación, las cuales pueden asociarse a la asimilación de los gases remanentes en el espacio libre de cada reactor (Headspace).

La mayor presión registrada correspondió al LAGM SP (2.485mbar) en una fase estacionaria definida, indicando que es factible producir biogás* H_2 a partir de un inóculo granular metanogénico sin necesidad de un pretratamiento previo del inóculo, bajo las condiciones específicas del presente estudio, confirmando lo encontrado en el ensayo previo (AHE48 h). Entre los pretratamientos evaluados, el correspondiente a 75°C-45min obtuvo el valor máximo de presión (2300mbar, ver **Figura 26a**), en el cual la producción de biogás mostró una tendencia a continuar más allá del tiempo de fermentación y sugiriendo entonces, una mayor producción potencial respecto al LAGM SP. Situación similar se presentó para el pretratamiento 100°C-30 min (1.602mbar, ver **Figura 26c**); las réplicas de estos pretratamientos también mostraron la tendencia mencionada aunque reportaron un valor más bajo de presión. Este comportamiento ha sido reportado en otros estudios relacionados con ensayos de AHE (Kawagoshi et al., 2005) y se ha asociado con un alto potencial de producción de H_2 del inóculo estudiado.

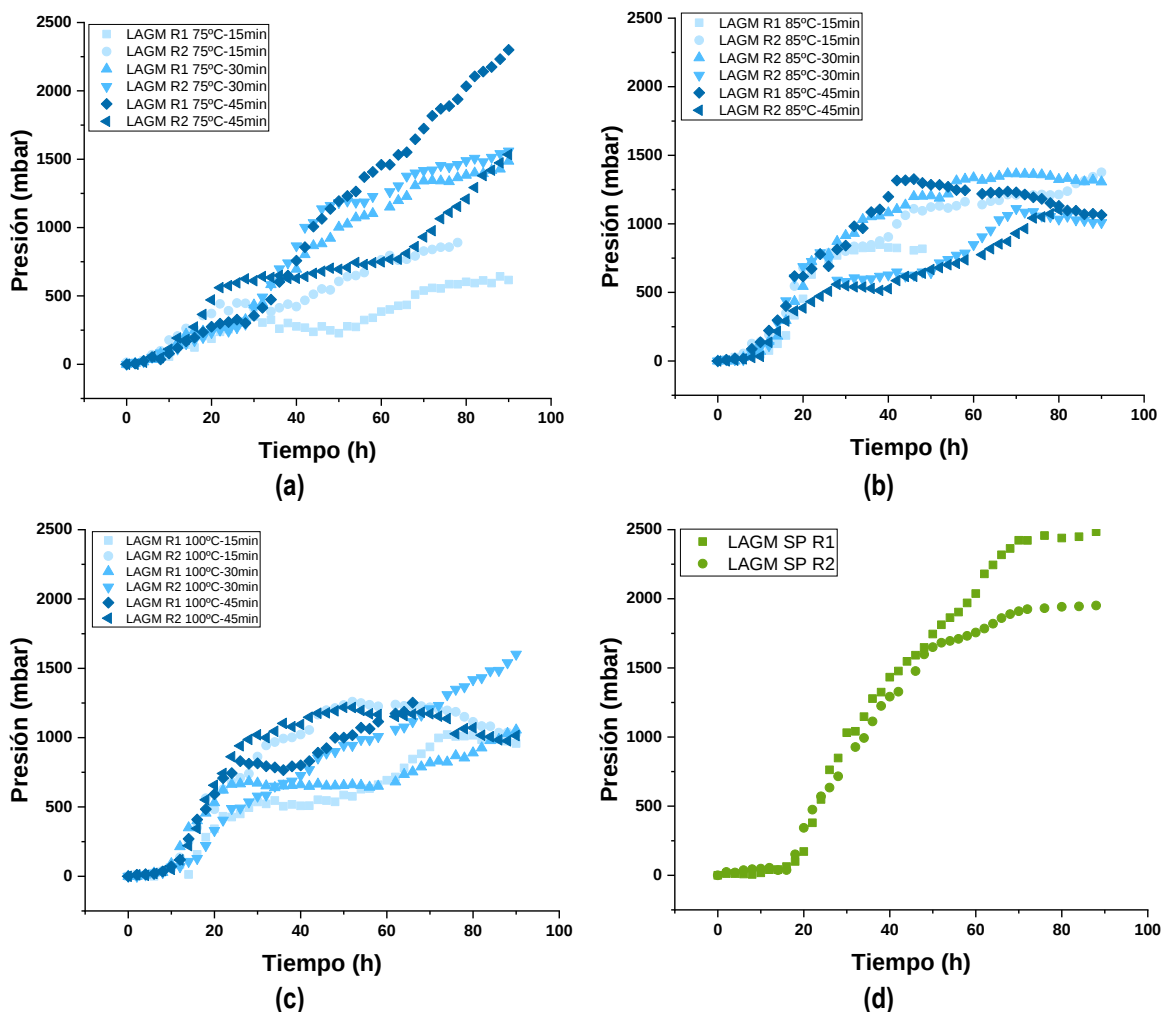


Figura 26. Presión ejercida por el biogás en la AHE del LAGM. Pretratamientos: (a) 75°C -15,30 y 45min; (b) 85°C -15,30 y 45min, (c) 100°C -15,30 y 45min y (d) LAGM SP- Sin pretratamiento
Nota: R1: Replica 1, R2: Replica 2

Las relativas variaciones entre las réplicas para algunos pretratamientos evaluados, pueden asociarse con la heterogeneidad del LAGM, en el cual, a pesar de que en este estudio se garantizó la misma cantidad (masa) de inóculo a cada reactor de acuerdo con la relación Sustrato/Inóculo, no se controló y/o aseguró la homogeneidad de características específicas de la masa adicionada como el tamaño del gránulo, su etapa de granulación y aspectos más complejos como sus propiedades bioquímicas individuales (consorcio e interacciones de los microorganismos que lo componen) las cuales pueden incidir en su respuesta frente a determinados procesos biológicos (Espinosa Chávez, 2007). Al respecto, algunos autores han reportado estrategias encaminadas a la homogenización de este tipo de inóculo como el tamizado (Hernandez-Mendoza & Buitrón, 2014), pero que puede ser desfavorable desde el punto de vista operacional y económico bajo una posible aplicación a escala real.

La **Figura 27** muestra el comportamiento de la presión ejercida por el biogás en la AHE del LAF para las diferentes magnitudes de T y t según el pretratamiento térmico evaluado y la condición sin pretratamiento - LAF SP. Se destaca el hecho de que la escala de presión para el LAF es menor a las observadas para el LAGM, siendo el pretratamiento 75°C-30min el que evidenció la mayor presión ejercida por el biogás durante el tiempo de fermentación (1.033mbar ver **Figura 27a**).

Un elemento sobresaliente en el comportamiento de la presión ejercida por el biogás para el LAF, lo constituye el decrecimiento de la presión para la condición SP y para algunos pretratamientos evaluados, alrededor de las 40 h del tiempo de fermentación, tal como se observó en el ensayo previo, no obstante, para algunos casos como la mayoría de los pretratamientos efectuados a 85°C, la presión ejercida por el biogás luego de un valor mínimo, toma nuevamente una fase creciente hasta llegar a su estabilización. Este comportamiento, de acuerdo con la revisión de literatura, no ha sido documentado de manera explícita y puede obedecer a condiciones específicas del ensayo. De esta manera, como se visualizó en el ensayo previo, el decrecimiento de la presión pudo estar asociado a la dinámica de absorción del CO₂ por parte del NaOH acoplado a cada reactor; al ocurrir una alta producción de este biogás en las primeras horas del ensayo, la tasa de absorción fue relativamente menor mostrando un primer pico o punto máximo de presión que tiende a decrecer conforme se equilibra la tasa de producción/absorción. Una vez equilibrada la tasa de producción/absorción de CO₂, la presión creciente registrada pudo ser ejercida principalmente por el H₂.

De otro lado, en el comportamiento de la presión ejercida por el biogás bajo la condición sin pretratamiento – LAF SP (ver **Figura 27 d**), fue evidente que no hubo una “recuperación” o fase creciente de presiones posterior al decaimiento asociado con la posible dinámica de producción/absorción de CO₂. Lo anterior sugiere que el pretratamiento térmico del LAF potencializa la producción de gases diferentes al CO₂, el cual según las condiciones propias del ensayo (sustrato, pretratamiento del inóculo, nutrientes, tiempo de fermentación) corresponde a H₂.

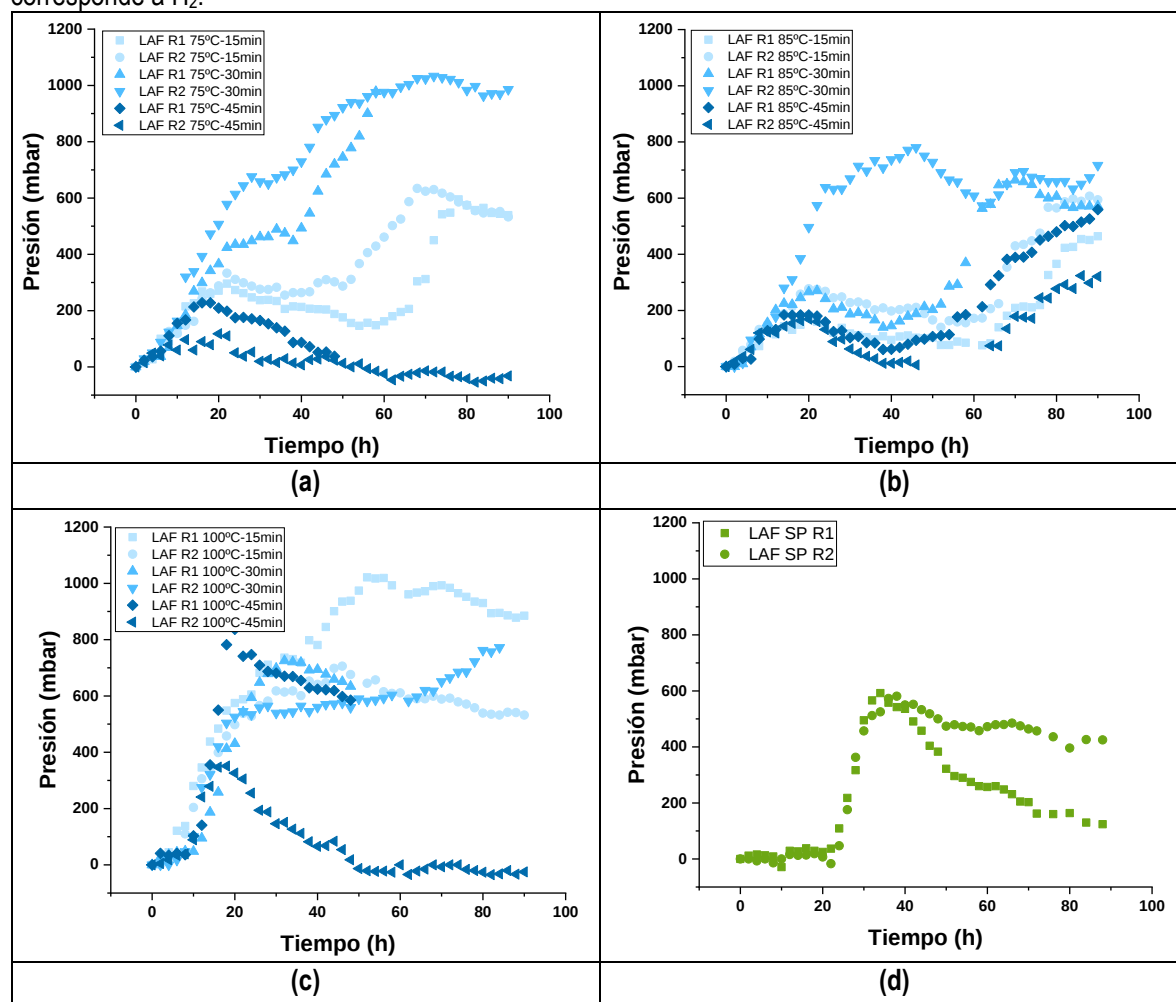
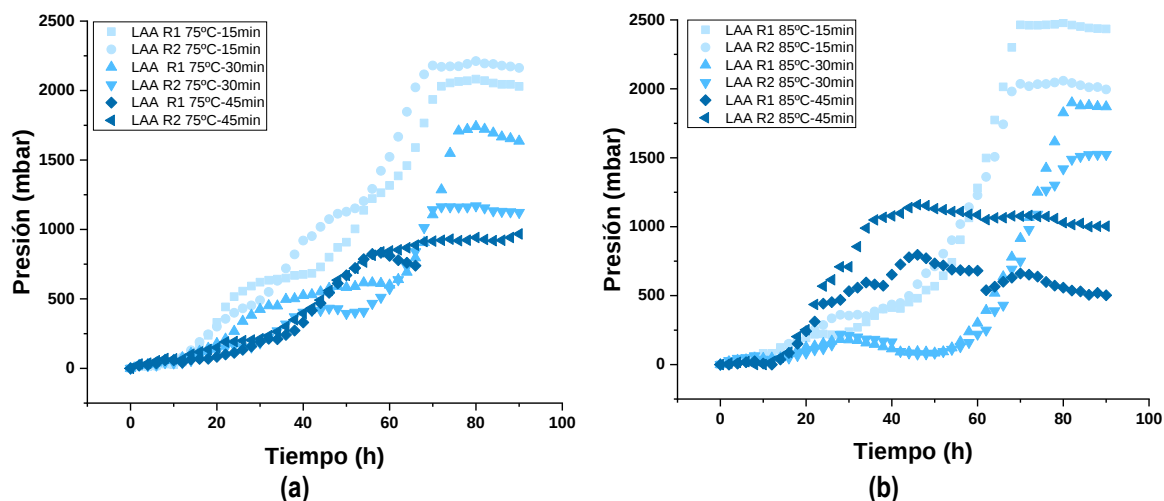


Figura 27. Presión ejercida por el biogás en la AHE del LAF. Pretratamientos: **(a)** 75°C -15,30 y 45min; **(b)** 85°C -15,30 y 45min, **(c)** 100°C -15,30 y 45min y **(d)** LAF SP- Sin pretratamiento. **Nota:** R1: Replica 1, R2: Replica 2

Sumado a lo anterior, es importante mencionar que para el LAF SP y en algunas condiciones con pretratamiento (75°C-45min y 100°C-45min), la continuidad del decaimiento de la presión ejercida por el biogás (y consecuentemente, la ausencia de una fase creciente de presión posterior) también pudo ser causada por rutas metabólicas específicas como la homoacetogénesis (Mu et al., 2007), la cual puede consumir entre el 11 y 43% del H_2 en procesos de FO (Saady, 2013; Zhou et al., 2017). Esta apreciación toma relevancia si se tiene en cuenta que los microorganismos homoacetogénicos están presentes en inóculos mixtos de fuentes de origen como el del LAF, como que son formadores de esporas; en ese sentido, pudieron sobrevivir al efecto del pretratamiento térmico (S.-E. Oh et al., 2009; S. E. Oh et al., 2003). Además, aunque el presente estudio utilizó estrategias reconocidas para suprimir la acción de los microorganismos homoacetogénicos presentes en el inóculo, tales como agitación y un absorbente de CO_2 (Chang et al., 2012; Nasr et al., 2015), el posible desbalance entre la producción y absorción de CO_2 en las primeras horas del tiempo de fermentación, pudieron favorecer la presencia de CO_2 en la fase líquida en concentraciones suficientes para favorecer el proceso autótrofo en referencia (Y. Liu & Wang, 2017).

En cuanto al tercer inóculo evaluado (LAA), el comportamiento de la presión ejercida por el biogás (ver **Figura 28**) indica valores hasta de 2.479 mbar (85°C-15min). Se resalta el hecho que en este tipo de inóculo, la fase creciente de presiones inició entre 30 – 50 h predominantemente, tiempo relativamente más tarde que en el LAGM y el LAF. Una vez inicia la fase creciente de producción de biogás, es notable una pendiente pronunciada de dicha fase, asociada a altas tasas de producción para luego continuar con una fase bien definida (y relativamente súbita) de presiones estables en la mayoría de los pretratamientos evaluados.

Al igual que el LAGM, el LAA bajo la condición sin pretratamiento térmico – LAA SP también registró presiones importantes de biogás, hasta de 1.820 mbar para la réplica de mayor productividad (ver **Figura 28d**). Lo anterior, confirma los atributos de este tipo de inóculo, que a pesar de su característica floculenta, baja concentración de SST y adaptación previa a un sustrato rico en proteínas, otras características como su alta proporcionalidad de SSV (0,83) y fuente de origen (Reactor acidogénico), pudieron garantizar la presencia de microorganismos adaptados a las condiciones específicas para la producción de H_2 .



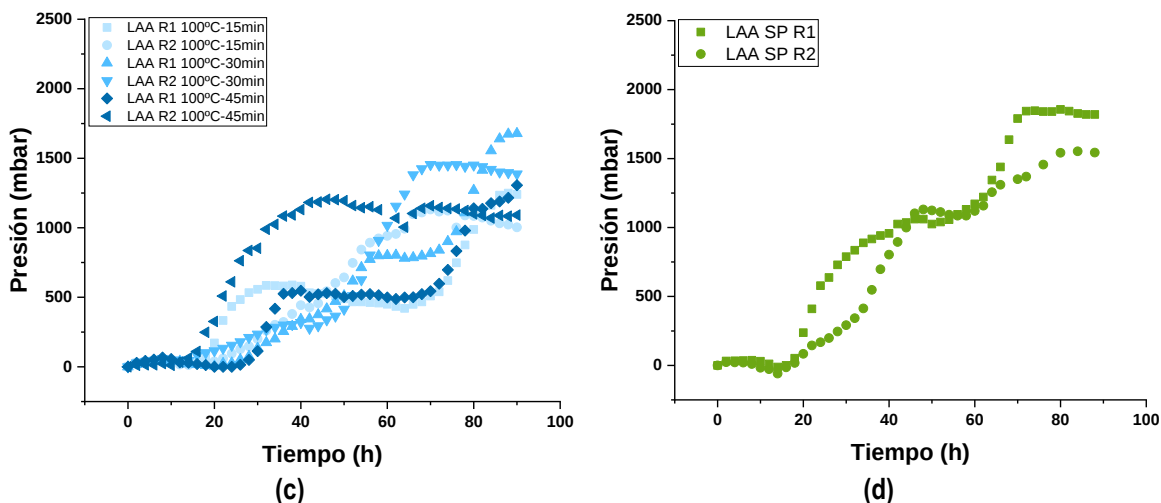
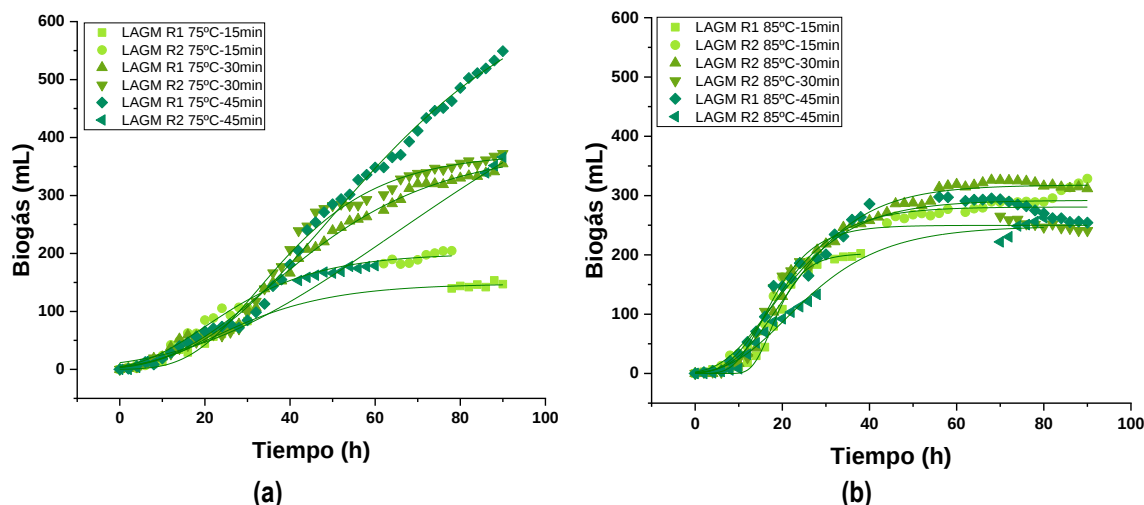


Figura 28. Presión ejercida por el biogás en la AHE del LAA. Pretratamientos: (a) 75°C -15,30 y 45min; (b) 85°C -15,30 y 45min, (c) 100°C -15,30 y 45min y (d) LAA SP- Sin pretratamiento

Nota: R1: Replica 1, R2: Replica 2

5.1.3.2 Análisis cinético del ensayo de AHE para tres inóculos

Con el objetivo de describir el efecto del pretratamiento térmico sobre el progreso acumulativo de producción de biogás y las variables cinéticas asociadas como la fase de latencia y la tasa específica de producción de biogás, el volumen de biogás estimado a partir de las curvas de presión con y sin pretratamiento térmico (a condiciones normales de presión y temperatura, 1 atm y 25°C respectivamente) se ajustó al modelo predictivo de Gompertz. De acuerdo con (Logan et al., 2002), para las condiciones específicas del presente estudio, es posible relacionar la totalidad del biogás generado con H_2 y en ese sentido, se definirá en este capítulo, a la totalidad del biogás cuantificado como Biogás* H_2 . La **Figura 29** muestra las curvas de producción de Biogás* H_2 en la AHE del LAGM para las diferentes condiciones del pretratamiento térmico (ver **Figura 29a**, b y c) y bajo la condición SP (ver **Figura 29d**).



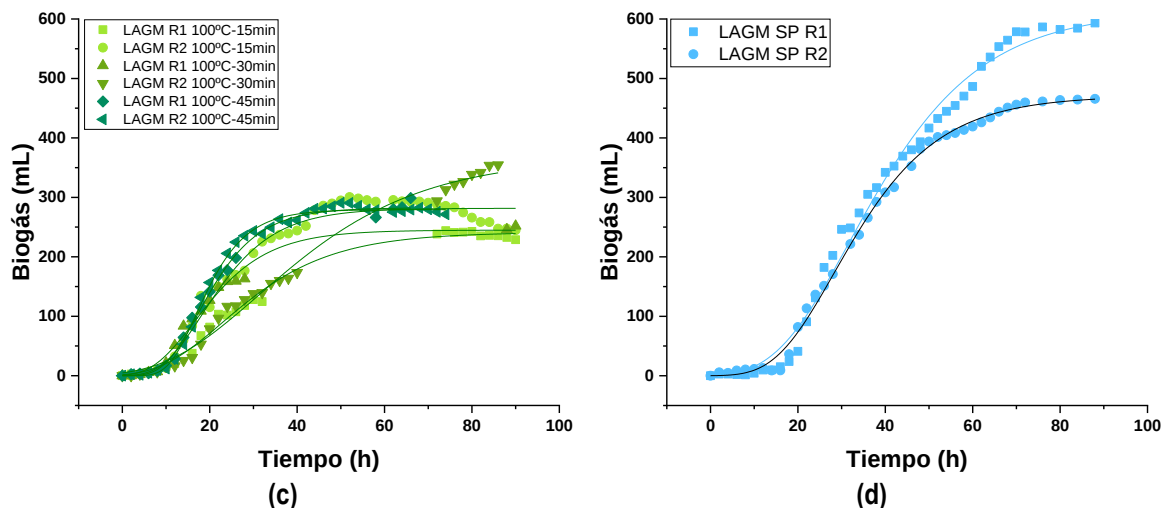


Figura 29. Producción de biogás*H₂ en la AHE del LAGM. Pretratamientos: (a) 75°C -15,30 y 45min; (b) 85°C -15,30 y 45min, (c) 100°C -15,30 y 45min y (d) LAGM SP- Sin pretratamiento

Nota:

-R1: Replica 1, R2: Replica 2

-Las líneas continuas representan el ajuste mediante el modelo predictivo de Gompertz.

La **Tabla 13** muestra los parámetros cinéticos del LAGM para los diferentes condiciones evaluados (con y sin pretratamiento térmico) de acuerdo con el modelo predictivo de Gompertz. El LAGM registró una producción máxima de Biogás*H₂ (P) o producción potencial estimada entre 147,9 y 693,7mL; cuyo límite superior correspondió al pretratamiento 75°C-45min, valor que fue aproximadamente un 11,5% más alto que la producción potencial registrada para el LAGM SP, el cual corresponde a la segunda mejor condición para este parámetro cinético (613,8mLBiogás).

Tabla 13. Parámetros cinéticos del LAGM para los diferentes pretratamientos, de acuerdo al modelo predictivo de Gompertz.

PRETRATAMIENTO	P (mLBiogás)	Rm (mLBiogás.h ⁻¹)	λ (h)
R1 75°C-15min	147,9	3,4	5,7
R2 75°C-15min	200,0	4,9	4,9
R1 75°C-30min	381,6	6,2	11,9
R2 75°C-30min	373,0	8,6	16,4
R1 75°C-45min	693,7	8,0	18,5
R2 75°C-45min	636,4	5,0	18,0
R1 85°C-15min	202,6	17,5	13,1
R2 85°C-15min	292,0	9,8	6,1
R1 85°C-30min	318,0	10,7	8,5
R2 85°C-30min	249,8	14,2	9,0
R1 85°C-45min	280,8	11,2	7,4
R2 85°C-45min	248,4	7,2	8,0
R1 100°C-15min	241,2	6,3	8,6
R2 100°C-15min	281,6	11,3	9,1
R1 100°C-30min	244,9	9,5	6,9
R2 100°C-30min	367,9	6,4	10,0
R1 100°C-45min	282,5	13,3	9,5
R2 100°C-45min	279,4	16,0	10,5
LAGM SP	613,8	13,4	15,0
LAGM SP	470,7	12,9	14,9

Lo anterior indica que aunque el LAGM tiene potencialidad de producir Biogás*H₂ sin un tratamiento previo para inhibir los microorganismos consumidores de H₂ como las arqueas metanogénicas, fue evidente que para la condición de 75°C-45min el pretratamiento térmico potencializó en cierta medida esa capacidad, posiblemente por los atributos adicionales a su capacidad de inhibición ampliamente reconocidas para este tipo de pretratamiento, como el hecho de que favorece la germinación de las esporas de aquellos microorganismos productores de H₂ que adoptan esta característica, actuando como un “sub letal” choque térmico que promueve su activación (Freda R Hawkes et al., 2007; Setlow, 2003; Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009).

De otro lado, también fue evidente que para las demás condiciones del pretratamiento térmico bajo el tiempo de fermentación evaluado, la producción potencial de Biogás*H₂ no superó la producción potencial del LAGM SP. Así mismo, de acuerdo con la **Figura 30**, los mayores de P, estuvieron distantes a la mediana de los datos para este parámetro cinético.

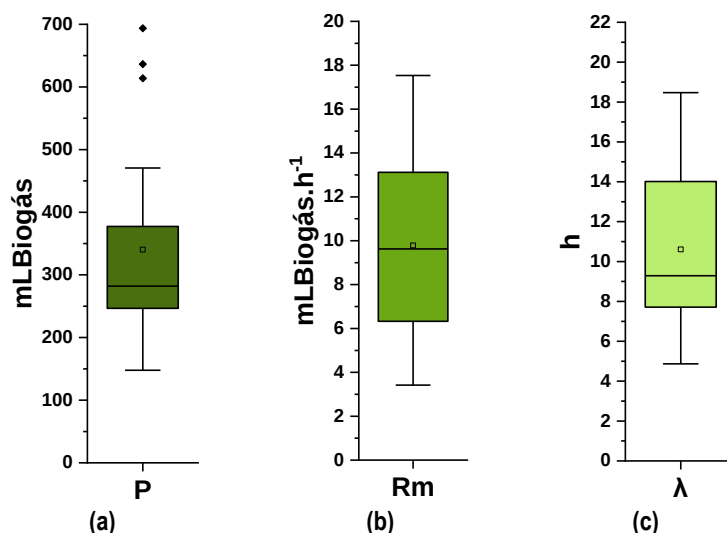


Figura 30. Distribución de los valores mínimos y máximos para los parámetros cinéticos del LAGM. (a) P; (b) Rm y (c) λ.

De esta manera, es posible concluir que el pretratamiento térmico del inóculo, solo potencializó la producción de Biogás*H₂ para una condición específica (75°C-45min), mostrando un efecto en cierta medida desfavorable para las demás condiciones evaluadas de T y t si se compara con la producción potencial del LAGM SP. Al respecto, autores como (Baghchehsaraee et al., 2008) indican que determinados valores de T y t en el pretratamiento térmico pueden inhibir los microorganismos productores de H₂ no formadores de esporas, y en ese sentido, disminuye la producción potencial de H₂. Por otra parte, si se tiene en cuenta que la menor producción potencial de Biogás*H₂ se registró para el pretratamiento a 75°C-15min (147,9mL), es apropiado decir que esta condición, más que considerarse poco eficiente para la inhibición de las BCH (debido a que el LAGM SP si presentó un valor significativo de este parámetro), puede catalogarse como una condición poco eficiente para la ocurrencia de otros atributos del pretratamiento térmico, como la reactivación de esporas de las BPH.

En cuanto a la tasa máxima de producción de Biogás*H₂ - Rm (mL.h⁻¹) del LAGM, el máximo valor fue registrado para el pretratamiento a 85°C-15min (17,5 mLBiogas.h⁻¹, ver **Tabla 13** y **Figura 30**), lo cual sugiere que no necesariamente una alta tasa de producción de biogás se traduce en una mayor producción potencial del mismo, contrario a lo que comúnmente se ha demostrado en estudios de AHE evaluando el efecto de diferentes tipos de pretratamiento (Chang et al., 2011; Dong et al., 2010) y consistente en cierta medida con autores como (Song et al., 2012) quienes no encontraron en su estudio una clara asociación entre Rm y P.

Con relación a la fase o periodo de latencia descrita por el parámetro cinético Lambda (λ), los valores máximos registrados (18,5 y 18,0 h) correspondieron al pretratamiento con mayor producción potencial de Biogás*H₂ (75°C-45min). Las mayores fases de latencia ocurrieron predominantemente para el pretratamiento térmico a 75°C (para los casos de λ : 11,9 y 16,4h) y para el LAGM SP (λ : 15h), las cuales pudieron incidir en las menores tasas de producción de biogás*H₂ traducidas en curvas de producción volumétrica con pendientes poco pronunciadas (ver **Figura 29** a y c), pero con un mayor parámetro P como se mencionó anteriormente.

La **Figura 31** muestra las curvas de producción de biogás*H₂ y la línea correspondiente al ajuste del modelo predictivo de Gompertz, en la AHE del LAF para las diferentes condiciones del pretratamiento térmico (ver **Figura 31** a, b y c) y bajo la condición SP (ver **Figura 31** d). Se destaca que para algunos pretratamientos, las fases de crecimiento exponencial se presentaron en un tiempo de fermentación superior a 40 h (**Figura 31** a y b).

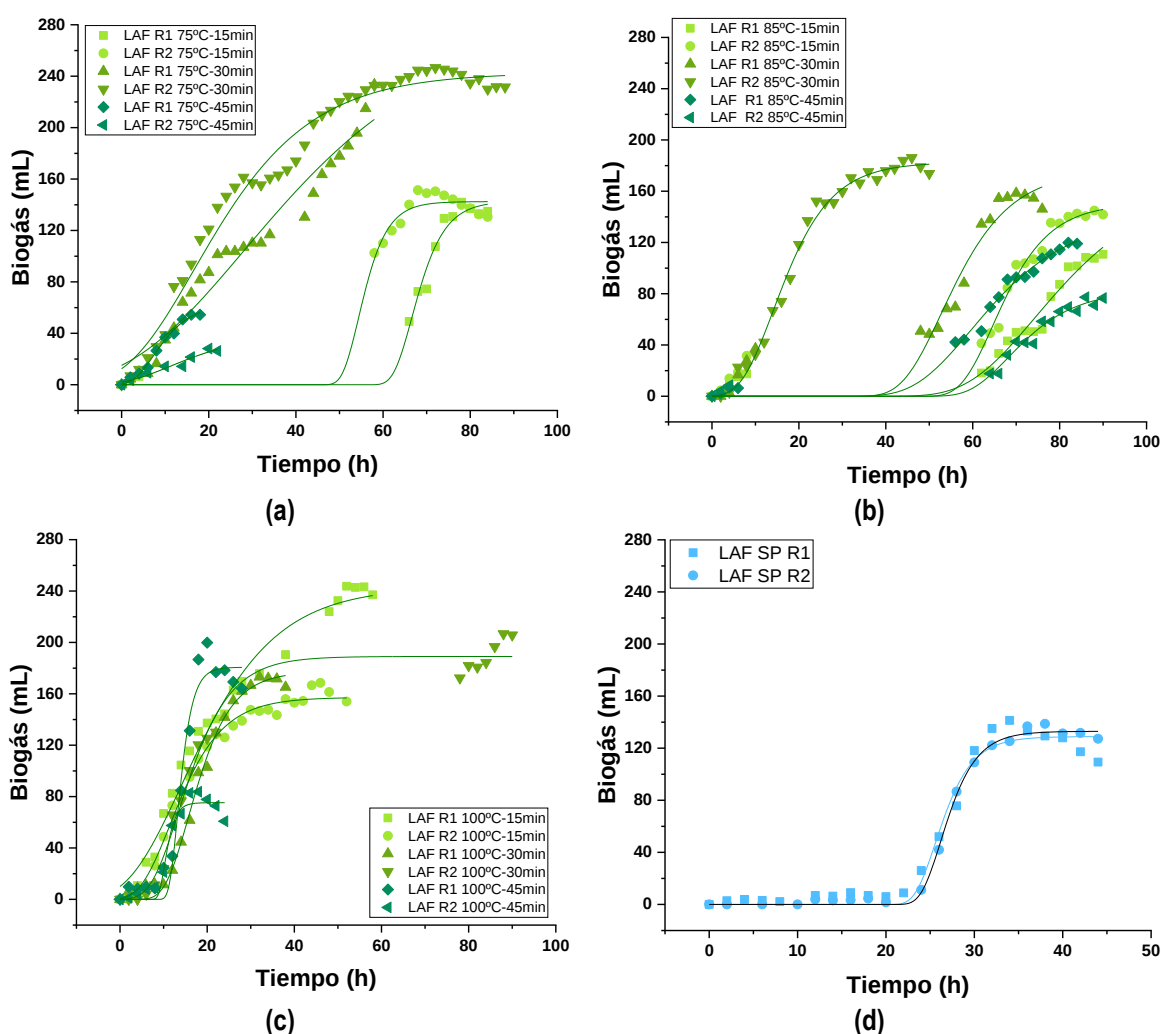


Figura 31. Producción de biogás*H₂ en la AHE del LAF. Pretratamientos: (a) 75°C -15,30 y 45min; (b) 85°C -15,30 y 45min, (c) 100°C -15,30 y 45min y (d) LAF SP- Sin pretratamiento

Nota:

-R1: Replica 1, R2: Replica 2

-Las líneas continuas representan el ajuste mediante el modelo predictivo de Gompertz.

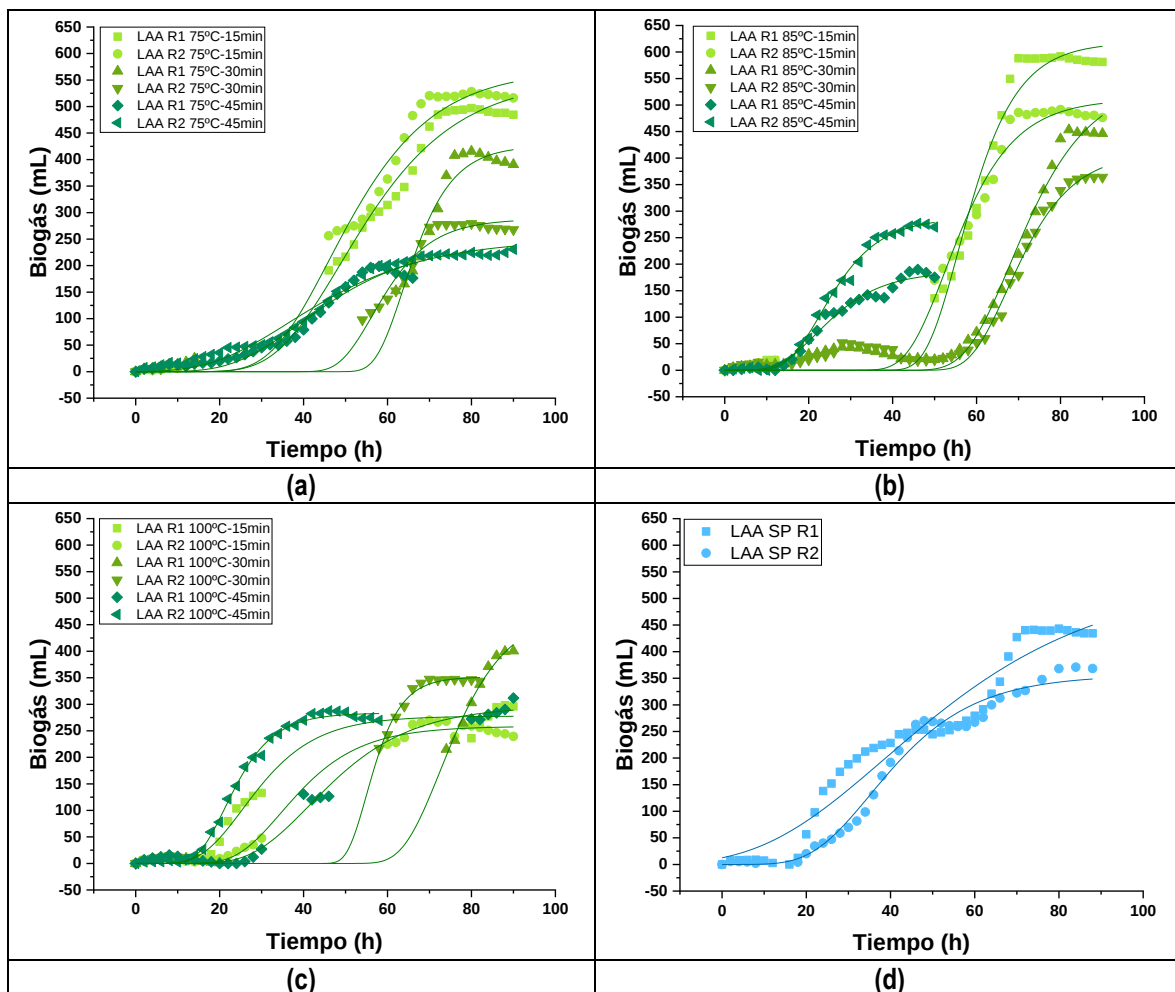
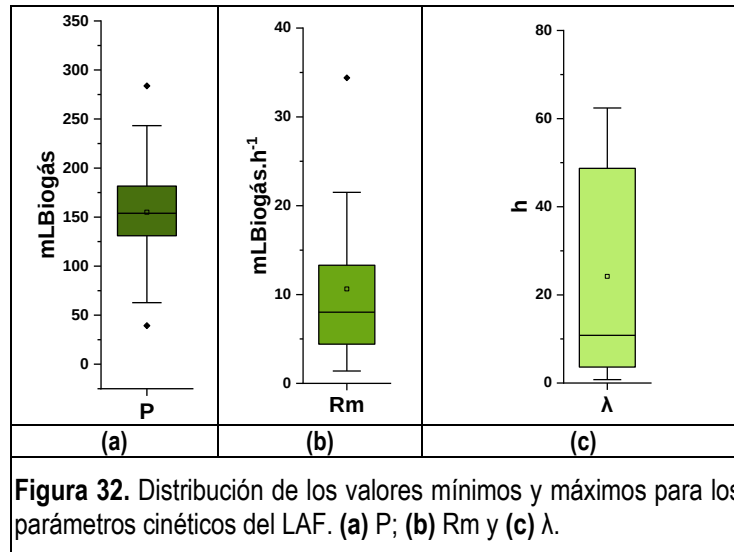
La **Tabla 14** muestra los parámetros cinéticos del LAF para los diferentes condiciones evaluadas (con y sin pretratamiento térmico), de acuerdo con el modelo predictivo de Gompertz. El LAF presentó una producción máxima de Biogás*H₂ (P) o producción potencial, estimada entre 39,4 y 283,8mL; cuyo límite superior fue registrado por el pretratamiento a 75°C-30min y representa un valor 53% aproximadamente más alto que la producción potencial para la condición sin pretratamiento – LAF SP. Como se mencionó anteriormente respecto al comportamiento de la presión ejercida por el biogás, es evidente que el pretratamiento térmico tiene un efecto positivo para la producción potencial de Biogás*H₂ para el LAF según el ajuste a través del modelo de Gompertz.

Así mismo, es consistente que el decaimiento de la presión que caracterizó algunas condiciones de pretratamiento para el LAF mencionadas anteriormente (asociadas a la posible dinámica de producción/absorción de CO₂ en las primeras 40 h del tiempo de fermentación), se interprete a través del modelo predictivo de Gompertz con periodos de latencia altos, del orden 50 y 60 h en los casos más pronunciados y con una mayor variabilidad entre las condiciones evaluadas (ver **Figura 32**). Por otra parte, la tasa máxima de producción de Biogás*H₂ - Rm (mL.h⁻¹) del LAF registró su valor máximo para el pretratamiento a 100°C-45min (Rm: 34,4 mL.h⁻¹), no obstante este valor puede considerarse atípico para las características propias del inoculo en esta variable (ver **Figura 32a**); tal como se evidenció para el LAGM, altos valores de Rm no se traducen en altos valores de P.

Tabla 14. Parámetros cinéticos del LAF para los diferentes pretratamientos, de acuerdo al modelo predictivo de Gompertz.

PRETRATAMIENTO	P (mLBiogás)	Rm (mLBiogás.h ⁻¹)	λ (h)
R1 75°C-15min	142,8	12,4	62,4
R2 75°C-15min	142,5	14,2	50,7
R1 75°C-30min	283,8	4,0	2,0
R2 75°C-30min	242,7	5,9	1,3
R1 75°C-45min	62,8	4,8	2,6
R2 75°C-45min	39,4	1,4	0,8
R1 85°C-15min	167,3	4,0	58,9
R2 85°C-15min	150,5	7,5	57,3
R1 85°C-30min	176,3	7,2	43,8
R2 85°C-30min	182,6	9,0	6,7
R1 85°C-45min	140,9	4,0	46,7
R2 85°C-45min	82,8	3,5	59,5
R1 100°C-15min	243,2	7,3	1,9
R2 100°C-15min	157,2	8,5	4,6
R1 100°C-30min	177,3	11,9	10,3
R2 100°C-30min	189,1	10,6	7,0
R1 100°C-45min	180,7	34,4	11,3
R2 100°C-45min	75,3	20,1	8,9
LAF SP	133,0	21,5	24,0
LAF SP	128,9	20,3	23,3

La **Figura 33** muestra las curvas de producción de Biogás*H₂ en la AHE del LAA para las diferentes condiciones del pretratamiento térmico (ver **Figura 33 a, b y c**) y bajo la condición SP (ver **Figura 33 d**), en las cuales, como se indicó en el análisis de la presión ejercida por el biogás, predomina un comportamiento con fases de latencia amplias, que continúan hacia una fase creciente con altas pendientes hasta llegar a una fase de presiones estables bien definidas.



La **Tabla 15** muestra los parámetros cinéticos del LAA para los diferentes pretratamientos evaluados, de acuerdo con el modelo predictivo de Gompertz. El LAA para las condiciones evaluadas, tiene una producción máxima de Biogás*H₂ (P) o producción potencial estimada entre 186,4 y 618,3 mL; cuyo límite superior fue registrado por el pretratamiento a 85°C-15min, valor aproximadamente 12% más alto que la producción potencial registrada para el LAA SP (541,2mL para la réplica con mayor producción). Por consiguiente, es posible inferir que para ciertas magnitudes de T y t (aquellos que presentaron mayor P en la **Tabla 15** respecto al LAA SP) y bajo las condiciones del presente estudio, el pretratamiento térmico puede potencializar la capacidad de producción de Biogás*H₂ para el LAA.

Tabla 15. Parámetros cinéticos del LAA para los diferentes pretratamientos, de acuerdo al modelo predictivo de Gompertz.

PRETRATAMIENTO	P (mLBiogás)	Rm (mLBiogás.h ⁻¹)	λ (h)
R1 75°C-15min	552,9	13,2	33,4
R2 75°C-15min	569,7	15,1	32,2
R1 75°C-30min	426,2	24,1	57,3
R2 75°C-30min	288,0	13,6	48,6
R1 75°C-45min	245,8	5,7	23,1
R2 75°C-45min	250,5	4,9	17,8
R1 85°C-15min	618,3	29,2	48,0
R2 85°C-15min	511,6	20,6	43,4
R1 85°C-30min	546,4	18,8	57,3
R2 85°C-30min	411,7	17,3	58,5
R1 85°C-45min	186,4	7,8	13,0
R2 85°C-45min	287,4	13,6	15,0
R1 100°C-15min	277,8	10,5	15,8
R2 100°C-15min	258,6	9,1	24,1
R1 100°C-30min	476,1	19,6	63,6
R2 100°C-30min	351,4	28,1	50,4
R1 100°C-45min	297,1	8,0	27,8
R2 100°C-45min	283,5	16,1	14,8
LAA SP	541,2	6,8	9,5
LAA SP	356,3	9,5	21,4

Como fue evidente a través del análisis gráfico de presiones, el LAA se caracteriza por tener amplias fases de latencia λ (Entre 9,5 y 63,6h, ver **Figura 34**), pero contrario a lo observado para el LAF (que también presentó altos valores de λ), fueron en cierta medida proporcionales a P y a la tasa máxima de producción de Biogás*H₂ - Rm (mL.h⁻¹). Respecto a este último parámetro, los valores estuvieron comprendidos entre 4,9 y 29,2 mL.h⁻¹, correspondiendo el valor límite superior a la condición con pretratamiento 85°C-15min, la cual como se mencionó anteriormente, tuvo la máxima producción de Biogás*H₂, coincidiendo con lo comúnmente reportado en ensayos de AHE (valores altos de Rm, se traducen en valores altos de P).

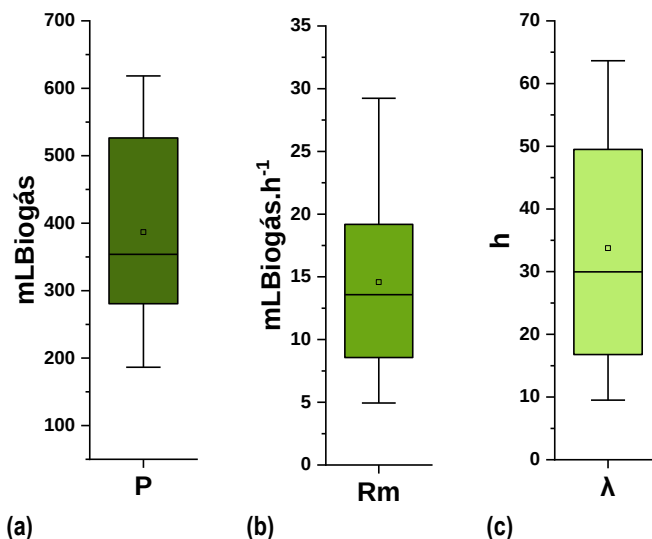


Figura 34. Distribución de los valores mínimos y máximos para los parámetros cinéticos del LAA. (a) P; (b) Rm y (c) λ .

5.1.3.3 Correlación de las características de la fase gaseosa con la fase líquida

La Tabla 16 muestra la caracterización de la fase líquida para los diferentes inóculos y condiciones de pretratamiento evaluadas para las réplicas que registraron el mayor valor del parámetro cinético P (producción potencial de biogás*H₂).

Tabla 16. Caracterización fisicoquímica de la fase líquida al final del ensayo

PRETRATAMIENTO	LAGM				LAF				LAA			
	Reducción de DQO (%)	Reducción de Carbohidratos (%)	pH (Unidades)	AGVs (mg.L ⁻¹)	Reducción de DQO (%)	Reducción de Carbohidratos (%)	pH (Unidades)	AGVs (mg.L ⁻¹)	Reducción de DQO (%)	Reducción de Carbohidratos (%)	pH (Unidades)	AGVs (mg.L ⁻¹)
75°C-15min	32,9	92,6	3,6	795,4	35,4	97,9	3,9	415,3	32,9	97,8	3,7	893,3
75°C-30min	19,7	70,2	3,3	713,1	38,6	97,5	3,9	611,2	34,0	97,9	3,4	889,4
75°C-45min	24,9	85,4	3,7	826,7	17,4	66,4	4,0	376,1	24,0	97,9	3,6	814,9
85°C-15min	24,3	97,4	3,5	697,4	40,3	98,2	3,8	391,8	33,8	97,8	3,5	865,9
85°C-30min	26,6	97,3	4,1	450,6	32,0	98,3	3,7	348,7	34,0	98,0	4,1	427,1
85°C-45min	29,2	98,2	4,7	391,8	30,6	94,5	4,0	399,6	23,2	97,7	3,5	321,3
100°C-15min	28,0	97,8	4,4	528,9	35,2	96,8	4,0	372,2	25,5	97,3	3,8	607,3
100°C-30min	30,3	83,7	4,0	854,1	40,0	97,8	4,1	387,9	24,3	97,6	3,8	673,9
100°C-45min	14,8	97,5	4,0	697,4	37,2	84,8	3,9	364,4	39,2	84,3	3,5	384,0
SP	28,3	98,1	4,3	967,7	33,5	74,6	4,0	372,0	34,6	97,9	3,6	709,2
Valor Max.	32,9	98,2	4,7	967,7	40,3	98,3	4,1	611,2	39,2	98,0	4,1	893,3
Valor Min.	14,8	70,2	3,3	391,8	17,4	66,4	3,7	348,7	23,2	84,3	3,4	321,3

Para todos los inóculos, la reducción de DQO fue relativamente baja (máximo del 40,3%), siendo consistente con el proceso de FO en el cual no hay una mineralización completa de la materia orgánica y los metabolitos generados como los AGVs aportan a esta variable (Antonopoulou et al., 2007b). Así mismo, de acuerdo con la

Figura 35, existe cierta relación directa entre el contenido de AGVs y la producción máxima potencial de Biogás*H₂ (P) para cada condición evaluada, consistente con lo reportado por diferentes autores (Elbeshbishy et al., 2011) y en el cual se destaca que el LAF tuvo predominantemente valores más bajos de estas dos variables, comparado con el LAGM y el LAA.

En cuanto a la reducción de carbohidratos (glucosa), los valores porcentuales estuvieron comprendidos entre 70 y 98, 66 y 98 y 84 y 98% para el LAGM, LAF y LAA respectivamente. Lo anterior expone la mayor capacidad del LAA y el LAGM en la transformación del sustrato, siendo consistente con los valores máximos obtenidos en diferentes estudios (y diferentes inóculos) evaluando el efecto del pretratamiento térmico (Baghchehsaraee, Nakhla, Karamanev, & Margaritis, 2009; Chang et al., 2011; J. Wang & Wan, 2008a; Yin et al., 2014). No obstante, es evidente que las condiciones SP también presentaron altos valores porcentuales de reducción del sustrato (del orden de 98%), lo que puede asociarse a la fuente de origen y la diversidad microbiológica del LAGM y el LAA, como se mencionó en capítulos anteriores.

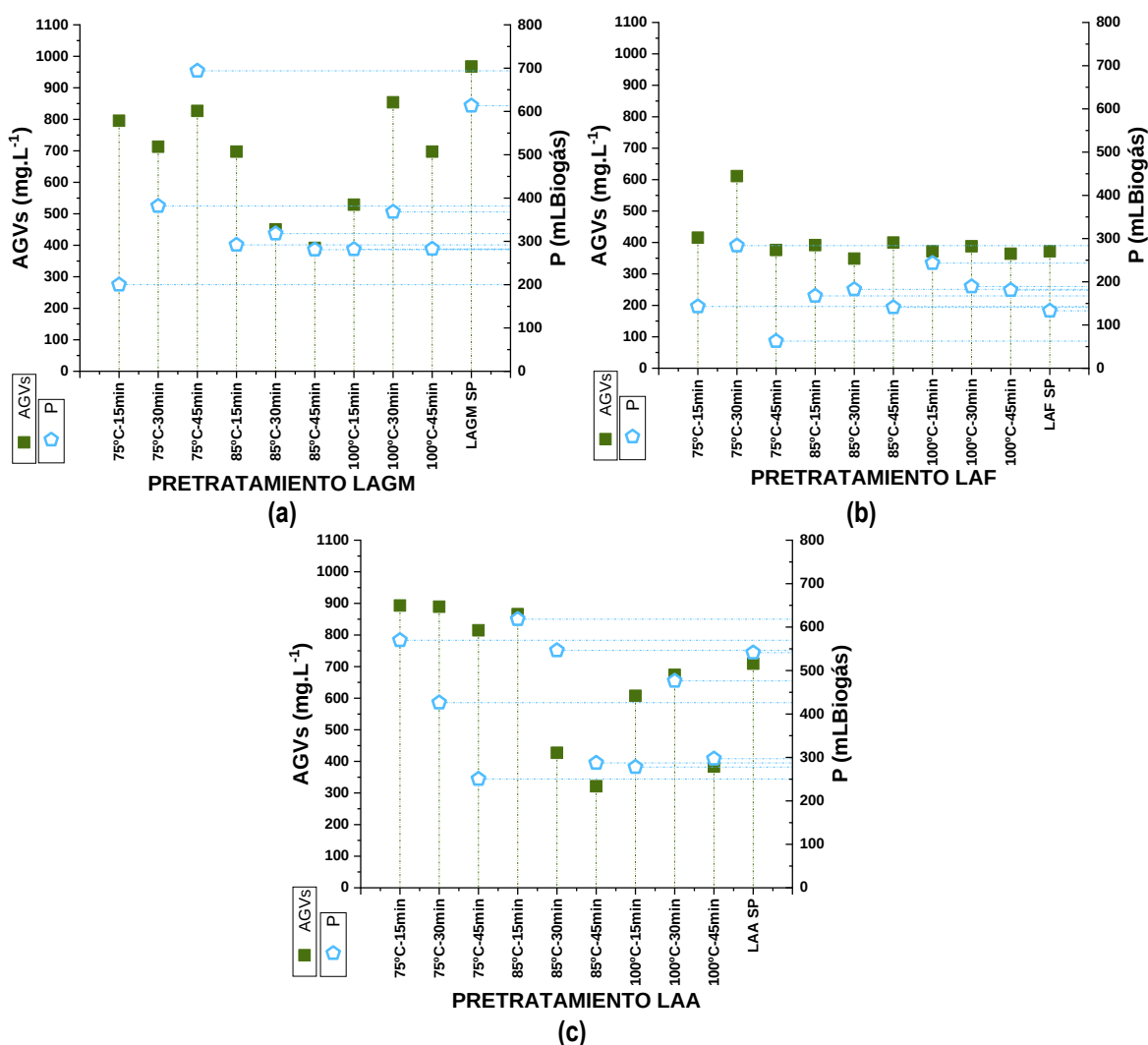


Figura 35. Contenido de AGVs y producción máxima potencial P. (a) LAGM, (b) LAF y (c) LAA.

Para el caso del pH, finalizado el tiempo de fermentación, los valores de esta variable estuvieron comprendidos entre 3,3 y 4,7 para el LAGM, 3,7 y 4,1 para el LAF y 3,4 y 4,1 para el LAA, valores más bajos que el pH inicial (5,4 ±0,1 Unidades) ocasionado predominantemente por la acumulación de AGVs en el medio de reacción (Kim

et al., 2011; Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009) y la posible reacción de estos últimos con el sistema carbonato (Davila-Vazquez et al., 2011). Los bajos valores de pH son comparables con otros estudios de FO utilizando glucosa como sustrato y para inóculos sometidos a un pretratamiento térmico (Chang et al., 2011; J. Wang & Wan, 2008a). Es necesario indicar que el decaimiento del pH hasta los valores registrados en el presente estudio, pudo favorecer en cierta medida la inhibición de microorganismos consumidores de H_2 para el caso de las condiciones SP (como fue discutido en el ensayo previo para el LAGM), sin embargo, es importante mencionar que este decaimiento pudo ser favorable hasta cierto punto, teniendo en cuenta que la actividad de las bacterias acidogénicas (y productoras de H_2) puede inhibirse a valores de pH inferiores a 4,5 unidades, rango en el cual también se puede favorecer la ocurrencia de otras rutas metabólicas en la FO con producción nula de H_2 como la correspondiente a la formación de alcoholes (Chang et al., 2011; Elbeshbishy et al., 2017; J. Wang & Wan, 2008a).

Además de los aspectos anteriormente mencionados, el análisis cinético y su correlación con las características fisicoquímicas de la fase líquida, permiten considerar los siguientes aspectos adicionales en el efecto del pretratamiento térmico sobre la AHE de los inóculos evaluados:

- La producción potencial de Biogás* H_2 (P) promedio en los ensayos de AHE según las condiciones de pretratamiento térmico evaluadas, fueron en su orden, para los seis valores más altos correspondientes a: (i) 665,1 mL (LAGM 75°C-45min), (ii) 564,9 mL (LAA 85°C-15min), (iii) 561,3 mL (LAA 75°C-15min), (iv) 525,9 mL (LAGM SP), (v), 479,0 (LAA 85°C-30min) y (vi) 448,8 mL (LAA SP), destacándose la alta productividad del LAGM y el LAA con y sin pretratamiento, frente al LAF.
- La evidente capacidad potencial del LAGM y el LAA en producir Biogás* H_2 sin un tratamiento previo del inóculo, sugiere la participación de otros factores en la AHE de este tipo de inóculos, como la fuente de origen y la diversidad microbiológica de los mismos, así como el pH del medio de reacción y el sustrato utilizado (Kawagoshi et al., 2005; Ren et al., 2008).
- El efecto del pretratamiento térmico, potencializó hasta un 53% la producción de Biogás* H_2 en el LAF. No obstante, este inóculo presentó los valores más bajos de P, lo cual puede relacionarse a que no tiene diversos atributos como granulación y su fuente de origen fue un reactor metanogénico correspondiente al tratamiento de ARD, en el cual los microorganismos productores de H_2 presentes en él, posiblemente estuvieron adaptados a bajas cargas orgánicas (y menor “estrés”) comparado con el LAGM y LAA.
- El mayor valor de P para el LAA (en promedio 564,9 mL bajo 85°C-15min) ocurrió con una reducción estimada del 97,8% del sustrato. Esto indica la capacidad del LAA en transformar este carbohidrato en Biogás* H_2 (y AGVs) predominantemente y a una alta tasa (Rm: Hasta 29,2 mLBiogás.h⁻¹).
- Para el LAGM, el mayor valor de P (en promedio 665,1 mL bajo 75°C-45min) ocurrió con un porcentaje de reducción del sustrato estimado de 85,4%. Aunque este porcentaje se encuentra dentro de lo reportado en la literatura (sustratos como la glucosa) y en ese sentido indica la capacidad de este inóculo en transformarla a Biogás* H_2 (y AGVs), la tasa en la cual se efectuó puede considerarse como baja (Rm: Hasta 8,0 mLBiogás.h⁻¹) si se compara con el correspondiente al LAA para la condición de mayor productividad (29,2 mLBiogás.h⁻¹). El relativo bajo valor de Rm para la mayor P en el LAGM, significó que las curvas de producción de Biogás* H_2 tuvieran una tendencia creciente (pero con pendientes bajas) más allá del tiempo de fermentación (que podría llegar a una fase estable hasta obtener una reducción del sustrato del orden del 97% por ejemplo).

La situación antes descrita, plantea que el efecto del pretratamiento térmico sobre la AHE de los inóculos evaluados, aporta criterios de decisión frente al objetivo de los procesos de FO a escala real en flujo continuo, por ejemplo: Mayor producción potencial de Biogás*H₂ pero a una baja tasa de producción (y posiblemente bajas tasas de reducción del sustrato que sugiera TRH más extensos o una estrategia de recirculación o pos-tratamiento del sustrato remanente no transformado en biogás o AGVs) o menor producción potencial de Biogás*H₂ a altas tasas de producción (y posiblemente altas tasas de reducción del sustrato sugiriendo una etapa de pos-tratamiento únicamente para el efluente rico en AGVs).

- Como aspecto adicional a la consideración anterior, en el LAA se observó que la producción potencial de Biogás no inició sino después de una amplia fase de letargo (λ alrededor de 40 y 48 h), mucho mayor que las observadas para el LAGM y LAF bajo las condiciones de pretratamiento con mayor productividad, y mayor a las reportadas por otros autores utilizando glucosa como sustrato con un inóculo pretratado térmicamente, en los cuales λ registra valores menores a 15 h predominantemente (Baghchehsaraee et al., 2008; Chang et al., 2011; Davila-Vazquez, Alatríste-Mondragón, de León-Rodríguez, & Razo-Flores, 2008; Yin et al., 2014). Adicionalmente, estudios reportan valores de λ de cero (o no detectable), y lo vinculan a la adaptación previa del inóculo al sustrato (C. C. Wang et al., 2003), lo cual en principio puede no ser consistente con el presente estudio en el sentido que el LAA fue previamente adaptado a glucosa, sin embargo, puede ser razonable en el sentido que en el presente estudio la variable de respuesta para calificar que el inóculo fue adaptado al sustrato, como se indica en la metodología, estuvo relacionado con la fase líquida (% reducción de carbohidratos) y no con la fase gaseosa.

Al respecto, en el contexto de la FO, la fase de latencia definida como el período que necesitan los microorganismos para adaptarse a un nuevo entorno cuando se transfieren de una condición extremadamente desfavorable a una favorable (Ruggeri et al., 2015), se puede ligar con la capacidad de “recuperación” (rápida o lenta) del inóculo al pretratamiento térmico (Mu et al., 2007) y en el contexto de la DA, la fase de latencia está asociada a la fase de hidrólisis, pero este escenario aplica a sustratos complejos y no solubles (caso contrario a sustratos altamente biodegradables como la glucosa). De esta manera, los diferentes estudios que utilizan modelos predictivos como el de Gompertz en la AHE de inóculos, no concluyen (de acuerdo con la revisión de literatura correspondiente al presente estudio) las ventajas, desventajas o implicaciones de tener un menor o mayor valor de esta variable, como si es el caso de los parámetros cinéticos de P y R_m. No en vano, la fase de latencia o de letargo ha sido considerada en el contexto de la microbiología como la etapa más temprana y menos comprendida del ciclo de crecimiento bacteriano (Rolfe et al., 2012).

Una estrategia que podría aportar elementos adicionales sobre la relación entre λ y P, es la realización de varias repeticiones del ensayo de AHE sobre el mismo inóculo pretratado, actividad que ha sido reportada en estudios como el de (Baghchehsaraee et al., 2008; Zhu & Béland, 2006).

- Aunque el pH al final del tiempo de fermentación, tuvo un decaimiento a valores comúnmente reportados en ensayos de AHE, se registraron valores finales que favorecen las rutas metabólicas con producción nula de H₂ e inhibitorias para la actividad enzimática de los microorganismos productores de este biogás (valores inferiores a 4-4,5 Unidades). Lo anterior, pudo no ser un factor determinante en la AHE del LAGM y LAA por sus características particulares, pero sí pudo tener una influencia en el LAF, evidenciado en los bajos valores de P.

5.1.4 Selección de la mejor combinación de T y t para el pretratamiento térmico

La **Tabla 17** muestra el rendimiento de Biogás*H₂ – Y y la Actividad Hidrogenónica Especifica - AHE o Tasa Especifica de producción de Biogás*H₂ promedio para el LAGM, LAF y LAA. El Rendimiento de Biogás - Y (mL Biogás.(g Glucosa_{Removida})⁻¹) promedio según las condiciones de pretratamiento térmico evaluadas, fueron en su orden, para los seis valores más altos correspondientes a: (i) 289,0 (LAA 85°C-15min), (ii) 286,9 (LAA 75°C-15min), (iii) 277,0 (LAGM 75°C-45min), (iv) 276,7 (LAGM SP), (v) 269,7 (LAGM 75°C-30min) y (vi) 244,6 (LAA 85°C-30min). Se destaca que el LAGM y el LAA obtuvieron mayores valores de Y respecto al LAF, como se muestra gráficamente en la **Figura 36**.

Tabla 17. Rendimiento de Biogás*H₂ y AHE promedio para el LAGM, LAF y LAA

PRETRATAMIENTO	LAGM		LAF		LAA	
	Y*	AHE**	Y	AHE**	Y*	AHE**
R1 75°C-15min	94,4	4,1	72,9	13,3	286,9	14,1
R2 75°C-15min						
R1 75°C-30min	269,7	7,4	135,0	4,9	182,9	18,8
R2 75°C-30min						
R1 75°C-45min	277,0	6,5	38,8	3,1	127,1	5,3
R2 75°C-45min						
R1 85°C-15min	127,5	13,7	80,8	5,8	289,0	24,9
R2 85°C-15min						
R1 85°C-30min	146,3	12,4	91,3	8,1	244,6	18,0
R2 85°C-30min						
R1 85°C-45min	135,7	9,2	59,2	3,8	121,4	10,7
R2 85°C-45min						
R1 100°C-15min	134,0	8,8	106,0	7,9	139,4	9,8
R2 100°C-15min						
R1 100°C-30min	184,9	7,9	93,9	11,3	212,2	23,8
R2 100°C-30min						
R1 100°C-45min	144,0	14,7	95,1	27,3	169,7	12,1
R2 100°C-45min						
SP R1	276,7	13,2	97,9	22,4	229,5	8,2
SP R1						
Nota: *Y - Rendimiento de Biogás: mLBiogás*H ₂ .(gGlucosaRemovida) ⁻¹ **AHE - Actividad Hidrogenónica Especifica - AHE o Tasa Especifica de producción de Biogás*H₂ : mLBiogás*H ₂ .(qSSV _{inicial} .h) ⁻¹						

El mayor rendimiento de Biogás*H₂ promedio del LAA (289,0 mL Biogás*H₂.(g Glucosa_{Removida})⁻¹ bajo 85°C-15min), equivalente a 2,13 mol Biogás*H₂.(mol Glucosa_{Removida})⁻¹, fue ligeramente menor al mayor rendimiento reportado por (Baghchehsaraee et al., 2008) al evaluar el efecto del pretratamiento térmico de un inóculo, el cual fue de 2,30 mol H₂.(g Glucosa_{Removida})⁻¹ bajo 65°C-30min. Adicionalmente, es importante indicar que los autores mencionados reportaron un rendimiento de 0,43 mol H₂.(mol Glucosa_{Removida})⁻¹ para el inóculo anaerobio sin pretratamiento, significativamente menor al LAGM SP en este estudio, el cual reportó, uno de los mayores rendimientos (2,04 mol Biogás*H₂.(mol Glucosa_{Removida})⁻¹ - ver **Tabla 18**). Esta diferencia puede atribuirse a las características del inóculo, que aunque ambos fueron de tipo anaerobio, el inóculo de este estudio tuvo una característica granular, la cual como se ha mencionado anteriormente, tiene diferentes atributos fisicoquímicos y bioquímicos que favorecen el proceso de FO.

De igual forma, el rendimiento Y del LAGM a 75°C-45min fue mayor al reportado por autores como Davila-Vazquez et al. (2008) el cual fue de $1,46 \text{ mL Biogás} \cdot \text{H}_2 \cdot (\text{mol Glucosa}_{\text{Removida}})^{-1}$ utilizando un inóculo granular pretatado al punto de ebullición por 40 min y a un pH inicial de 7,5 unidades. La diferencia en el rendimiento pudo estar asociada a que en el presente estudio se garantizaron condiciones como el pH inicial y la relación sustrato/microorganismos consideradas en el contexto local como óptimas para estudios de FO utilizando este inóculo en particular (Barrios, 2015; Yela Larrahondo & Peña Castañeda, 2015). Lo anterior corrobora el hecho de que no existe el pretratamiento “perfecto” del inóculo (Bundhoo et al., 2015) y su efectividad depende de las condiciones específicas en las que se lleve a cabo y de las características propias del inóculo/tipo de pretratamiento (Dessi et al., 2018; G. Kumar, Zhen, et al., 2016; L. Singh & Wahid, 2015).

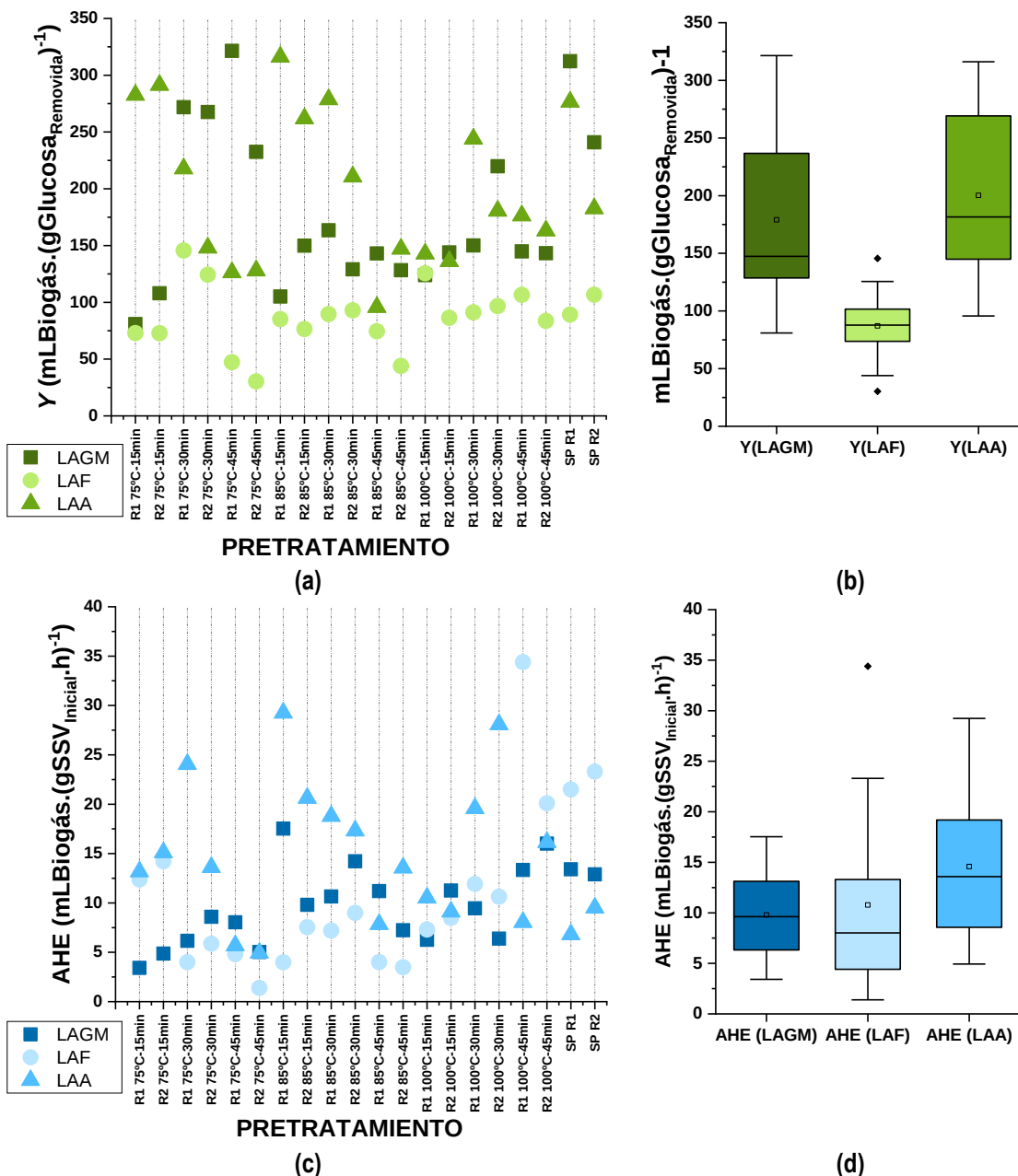


Figura 36. (a y b) Rendimiento de Biogás*H₂ – Y, (c y d) Actividad Hidrogenónica Específica - AHE o Tasa Específica de producción de Biogás*H₂ promedio para el LAGM, LAF y LAA.

Tanto el LAGM como el LAA (para las primeras cuatro condiciones listadas en la **Tabla 18**) tuvieron mayores rendimientos en la producción de H_2 por mol de glucosa removida, que otros estudios evaluando el efecto del pretratamiento térmico como los de Logan et al. (2002); Mu et al. (2007); Wang & Wan, (2008) y Kan (2013) (**ver Tabla 3**). De otro lado, el LAF tuvo un rendimiento máximo de $135,0 \text{ mL Biogás} \cdot H_2 \cdot (\text{g Glucosa}_{\text{Removida}})^{-1}$ (equivalente a $0,99 \text{ mol Biogás} \cdot H_2 \cdot (\text{mol Glucosa}_{\text{Removida}})^{-1}$) el cual se obtuvo pretratando el inóculo a 75°C durante 30min; este rendimiento fue menor al obtenido por autores como De Sá et al. (2013), quienes obtuvieron un rendimiento de $2,19 \text{ mol} \cdot H_2 \cdot (\text{mol Glucosa}_{\text{Removida}})^{-1}$ pretratando un inóculo anaerobio del tratamiento de AR municipal a 100°C durante 60 min. Lo anterior podría sugerir la evaluación de otras magnitudes de tiempo de exposición (superiores a 45 min, límite máximo del presente estudio) con el objetivo de obtener mayores rendimientos de H_2 para este inóculo.

Adicionalmente, la **Tabla 18** muestra la eficiencia de conversión para los mayores rendimientos de $\text{Biogás} \cdot H_2$ obtenidos en el presente estudio, indicador utilizado por diferentes autores (Cappelletti et al., 2011; Pecorini et al., 2019; J. Wang & Wan, 2008a) para comparar la potencialidad del inóculo o de determinadas condiciones operacionales en el proceso de FO, en llegar al rendimiento teórico máximo de producción de H_2 . Para el caso de la glucosa, generalmente se asume un rendimiento máximo teórico de cuatro (4) moles por mol de glucosa transformada.

Tabla 18. Eficiencia de conversión para los mejores rendimientos Y

No.	PRETRATAMIENTO	Y_{mL}	Y_{mol}	Eficiencia de Conversión (%)
1	LAA 85°C -15min	289,0	2,13	53,3
2	LAA 75°C -15min	286,9	2,11	52,8
3	LAGM 75°C -45min	277,0	2,04	51,0
4	LAGM SP	276,7	2,04	51,0
5	LAGM 75°C -30min	269,7	1,98	49,5
6	LAA 85°C -30min	244,6	1,80	45,0
Nota: Y_{mL} Rendimiento de Biogás: $\text{mL Biogás} \cdot H_2 \cdot (\text{g Glucosa}_{\text{Removida}})^{-1}$ Y_{mol} Rendimiento de Biogás: $\text{mol Biogás} \cdot H_2 \cdot (\text{mol Glucosa}_{\text{Removida}})^{-1}$ E Eficiencia de Conversión (%) : Eficiencia de Conversión asumiendo un máximo de $4 \text{ mol } H_2 \cdot (\text{mol Glucosa}_{\text{Removida}})^{-1}$				

De acuerdo con la **Tabla 18**, el LAA cuando es sometido a un pretratamiento térmico a una temperatura de 85°C durante 15 minutos tiene un rendimiento máximo de $\text{Biogás} \cdot H_2$ equivalente al 53,3% del rendimiento teórico máximo cuando se utiliza glucosa como sustrato, eficiencia de conversión que se minimiza ligeramente cuando es pretratado a una temperatura menor ($75^\circ\text{C} - 15\text{min}$, $E = 52,8\%$). Con el LAGM, es posible obtener eficiencias de conversión estimadas del 51% aun cuando no es sometido a un pretratamiento térmico.

La AHE ($\text{mL Biogás} \cdot H_2 \cdot (\text{gSSV}_{\text{Inicial}} \cdot \text{h})^{-1}$) promedio fueron en su orden, para los seis valores más altos correspondientes a: (i) 27,3 (LAF 100°C -45min), (ii) 24,9 (LAA 85°C -15min), (iii) 23,8 (LAA 100°C -30min), (iv) 22,4 (LAF SP), (v) 18,8 (LAA 75°C -30min), (vi) 18,0 (LAA 85°C -30min). Se destaca que el LAF presentó el valor más alto de AHE, aunque su rendimiento de biogás fue menor que el del LAGM y el LAA, indicando que no necesariamente existe una proporcionalidad ente estos dos parámetros, cuando se evalúan diferentes inóculos. Los valores de AHE en el presente estudio, fueron menores a las reportadas por (Baghchehsaraee et al., 2008), las cuales estuvieron comprendidas entre 64,6 y 109,6 $\text{mL Biogás} \cdot H_2 \cdot (\text{gSSV}_{\text{Inicial}} \cdot \text{h})^{-1}$, sin embargo, mientras los autores mencionados garantizaron un total de 0,24g de SSV de biomasa a cada reactor, en este estudio se garantizó 1gSSV.

Lo anterior resalta un aspecto importante en la AHE de un inóculo, pues aunque el LAGM, LAF y LAA tuvieron tasas máxima de producción de Biogás*H₂ - Rm (mL.h⁻¹) hasta de 17,5 – 34,4 y 29,2 respectivamente (ver Análisis de los parámetros cinéticos), comparables con el estudio de Baghchehsaraee et al. (2008), la AHE (mLBiogás.(gSSV_{inicial}.h)⁻¹), la cual relaciona el parámetro cinético de Rm con la cantidad de biomasa adicionada indica la tasa en que cierta cantidad de microorganismos transforma cierta cantidad de sustrato adicionado a H₂, pero no especifica esa cantidad de sustrato adicionado, por lo que se hace necesario para efectos comparativos, conocer la relación sustrato/microorganismos de cada caso particular. De esta manera, el alto valor de AHE del autor mencionado, se logró con una relación sustrato/microorganismos de 5, mucho mayor que la garantizada en el presente estudio (relación S/M de 2), lo que hace coherente las diferencias identificadas.

Los rendimientos de producción de Biogás*H₂ se encontraron dentro de lo reportado en diferentes estudios de FO, los cuales generalmente se encuentran entre 0,57 y 2,8 molHexosa (Penniston & Gueguim Kana, 2018; Saady, 2013). Las eficiencias de conversión (Hasta del 53,3% en el presente estudio) se encuentran dentro de lo reportado por la literatura utilizando glucosa como sustrato (J. Wang & Wan, 2008a; Yin et al., 2014) y los valores de AHE se encuentran dentro de lo considerado para un inóculo con una buena capacidad de transformación del sustrato a H₂, teniendo en cuenta su asociación con el parámetro cinético de Rm.

No obstante, es necesario indicar que los rendimientos máximos de producción de Biogás*H₂ encontrados en el presente estudio, ocurrieron bajo presiones parciales altas de la fase gaseosa (ver capítulo comportamiento de la presión ejercida por el biogás). Lo anterior puede sugerir presiones parciales de H₂ en la fase líquida (aun con agitación del medio de reacción) inhibitorias de la capacidad de oxidación de NADH por NADH:FdOxidoreductasa, la ocurrencia de otras rutas metabólicas como la fermentación butírica (en la cual el rendimiento máximo corresponde a 2 moles de H₂ por mol de glucosa adicionada) y la producción de metabolitos con producción nula de H₂ como alcoholes (Angenent et al., 2004; Davila-Vazquez et al., 2008; Sinha, Roy, & Das, 2015; Sivagurunathan et al., 2016), o como pudo ser el caso del LAF, la ocurrencia del procesos de homoacetogénesis con el consecuente consumo de este biogás (Dessià et al., 2018; Saady, 2013).

El análisis de varianza (ANOVA) de acuerdo con la **Tabla 19**, reporta que el Rendimiento de Biogás – Y (mLBiogás*H₂(gGlucosa_{Removida})⁻¹) para las variables cuantitativas de T y t y la variable cualitativa de inóculo fueron significativamente diferentes (p-valor < 0,05) en un intervalo de confianza del 95%.

Tabla 19. Análisis de varianza

FUENTE	GL	SC AJUST.	MC AJUST.	VALOR F	VALOR P
Lodo	2	119712	59856,2	79,59	0,000
Temperatura	2	5790	2894,8	3,85	0,034
Tiempo	2	17314	8657,1	11,51	0,000
Lodo*Temperatura	4	21307	5326,8	7,08	0,000
Lodo*Tiempo	4	42618	10654,4	14,17	0,000
Temperatura*Tiempo	4	9234	2308,4	3,07	0,033
Lodo*Temperatura*Tiempo	8	49443	6180,4	8,22	0,000
Error	27	20306	752,1		
Total	53	285724			

La post- ANOVA utilizando el método LSD Fisher (ver **Tabla 20**) encontró que son estadísticamente diferentes las condiciones consideradas como las de mayor rendimiento LAGM 75°C-45min, LAA 85°C-15min, LAA 75°C-15min y LAGM 75°C-30min respecto a las demás condiciones evaluadas, pero no hay diferencias significativas entre ellas en un nivel de significancia de 0,05.

Tabla 20. Prueba de significancia (post-ANOVA) LSD Fisher para las condiciones evaluadas

Lodo*Temperatura*Tiempo	N	Media	Agrupación										
LAA 85 15	2	289,002	A										
LAA 75 15	2	286,920	A										
LAGM 75 45	2	277,000	A										
LAGM 75 30	2	269,713	A										
LAA 85 30	2	244,632	A	B									
LAA 100 30	2	212,181		B	C								
LAGM 100 30	2	184,926			C	D							
LAA 75 30	2	182,861			C	D	E						
LAA 100 45	2	169,661			C	D	E	F					
LAGM 85 30	2	146,286				D	E	F	G				
LAGM 100 45	2	144,017				D	E	F	G				
LAA 100 15	2	139,422				D	E	F	G				
LAGM 85 45	2	135,656				D	E	F	G	H			
LAF 75 30	2	134,969				D	E	F	G	H			
LAGM 100 15	2	133,982				D	E	F	G	H			
LAGM 85 15	2	127,481					E	F	G	H	I		
LAA 75 45	2	127,090					E	F	G	H	I		
LAA 85 45	2	121,356						F	G	H	I		
LAF 100 15	2	106,005							G	H	I	J	
LAF 100 45	2	95,093							G	H	I	J	
LAGM 75 15	2	94,450							G	H	I	J	K
LAF 100 30	2	93,902							G	H	I	J	K
LAF 85 30	2	91,272							G	H	I	J	K
LAF 85 15	2	80,846								H	I	J	K
LAF 75 15	2	72,884									I	J	K
LAF 85 45	2	59,241										J	K
LAF 75 45	2	38,757											K

Nota: Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

En ese sentido, el LAGM y el LAA para las condiciones óptimas de T y t anteriormente mencionadas son factibles para su utilización como inóculo en la FO de un sustrato complejo, pues tienen un alto potencial de producción de Biogás*H₂. Para el caso del LAGM, se confirma la factibilidad de este inóculo en producir H₂ en procesos de FO como ha sido documentado por (Barrios, 2015; Hurtado Grueso & Muñoz Zambrano, 2013; Yela Larrahondo & Peña Castañeda, 2015).

En concordancia, se selecciona el LAA pretratado a 85°C-15min como inóculo para estimar la producción potencial de H₂ en la FO del ARY, de acuerdo con el análisis estadístico y sus atributos fisicoquímicos y bioquímicos los cuales incluyen su alta relación SV/ST (0,83), adaptabilidad previa a condiciones acidogénicas (bajos pH, TRH específicos, etc.), alta capacidad en la transformación de carbohidratos (eficiencias de reducción predominantes del orden del 98%) y alta AHE (24,9 mLBiogás.(gSSV_{Inicial}.h)⁻¹). Así mismo, teniendo en cuenta el análisis de los parámetros cinéticos para este inóculo, se decide incluir la condición SP.

5.2 Estimación de la producción potencial de H₂ en la FO del ARY

La estimación de la producción potencial de H₂ en la FO del ARY se realizó utilizando como inóculo el LAA pretratado a 85°C-15min y sin pretratamiento, seleccionados de acuerdo con el análisis estadístico y los atributos fisicoquímicos y bioquímicos de este inóculo descritos en el capítulo anterior.

5.2.1 Características del inóculo y ARY

La **Tabla 21** muestra las características del LAA después del periodo de adaptación al ARY, en el cual se evidencia el alto contenido de sólidos volátiles (Relación SSV/SSV: 0,84). Así mismo, fue evidente cierto aumento del pH respecto al inóculo sin adaptación (pH de 6,53 frente a 6,96) lo cual pudo estar relacionado con la producción de N-NH₄⁺ durante el periodo de adaptación (debido a la transformación de las proteínas presentes en el AR del sacrificio de ganado adicionada según las proporciones definidas en el periodo de adaptación), los cual pudieron en cierta medida neutralizar los AGVs producidos en el proceso de fermentación (Xiao, Han, & Liu, 2010).

Tabla 21. Características fisicoquímicas del inóculo adaptado a ARY

PARAMETRO	UNIDADES	VALOR
pH	Unidades	6,96
SST	mg.L ⁻¹	30.086
SSV	mg.L ⁻¹	25.178
SSV/SST	-	0,84

La **Tabla 22** muestra las principales características fisicoquímicas del ARY utilizada en los dos ensayos de FO (Inicial y confirmatorio); se evidencia que aunque para los dos ensayos el ARY tuvo características típicas registradas en el contexto local (Colin et al., 2007; Pérez Vidal et al., 2009) es notable la diferencia de parámetros como la DQO y carbohidratos totales. Estas diferencias radican en que la calidad del ARY (y cantidad) varía en función de factores como la variedad de la yuca, la edad de la planta, el tiempo de almacenamiento de las raíces y la tecnología empleada para la extracción (Alarcón & Dufour, 1998; Jurado & Ortiz, 2006; Torres et al., 2010). Es necesario precisar, como se detalla en la metodología, que se garantizó una misma relación Sustrato:Inóculo (mgDQO.L⁻¹:mgSSV_{Lodo}.L⁻¹) en los dos ensayos de FO del ARY en referencia.

Tabla 22. Características físicoquímicas del ARY

PARÁMETRO FÍSICOQUÍMICO	UNIDADES	VALOR	
		ENSAYO 1	ENSAYO 2
DQO Total	mg.L ⁻¹	2.317	5.103
Carbohidratos Totales	mg.L ⁻¹	1.798	4.570
SST	mg.L ⁻¹	910	1.712
pH	Unidades	4,38	4,65
Alcalinidad Total	mgCaCO ₃ .L ⁻¹	3,8	4,9
Alcalinidad Bicarbonática	mgCaCO ₃ .L ⁻¹	0	0
AGV's (Equivalentes a HAc)	mg.L ⁻¹	160	120

5.2.2 Comportamiento de la presión ejercida por el biogás

La **Figura 37** muestra el comportamiento de la presión ejercida por el biogás en la FO del ARY, donde se evidencia un crecimiento de la presión hasta las 16h de fermentación para los rectores en las cuales el LAA fue sometido a un pretratamiento de 85°C durante un tiempo de exposición de 15 min, magnitudes de t_y y t_d , que maximizan la producción potencial de Biogás*H₂ para este inóculo. El inóculo pretratado registra valores de presión hasta de 79 mbar, que posteriormente, muestran un comportamiento descendente. Los puntos máximos de presión, sugieren que la producción de Biogás*H₂ ocurre hasta alrededor de las 16h del tiempo de fermentación, no obstante, es necesario indicar que de acuerdo con el sustrato utilizado (ARY) es pertinente confirmar su estimación (contenido de H₂ en el biogás) a partir de análisis de cromatografía de gases para los reactores representativos como se discutirá más adelante.

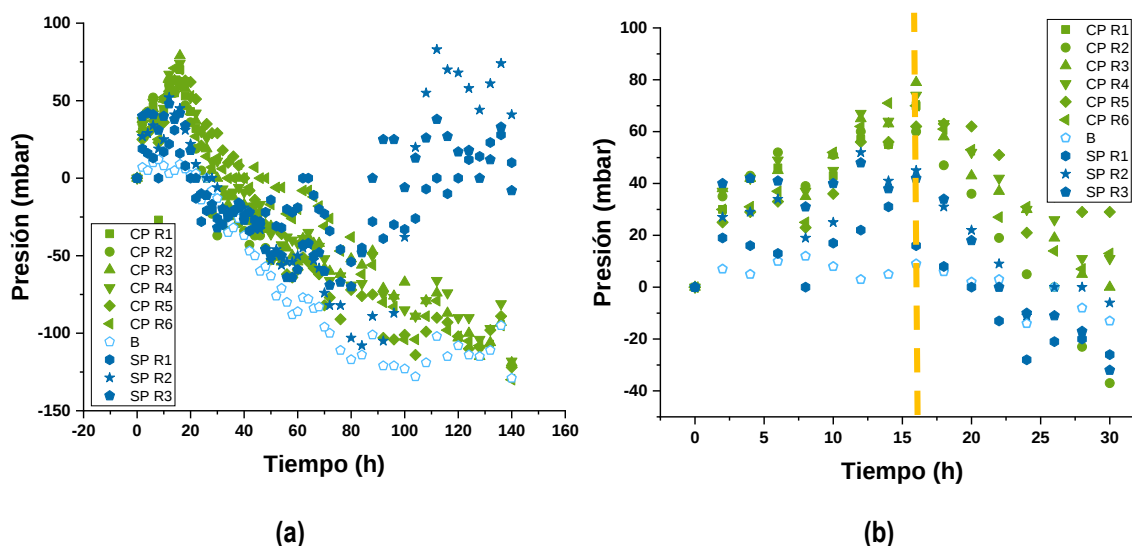


Figura 37. Comportamiento de la presión ejercida por el biogás en la FO del ARY en el Ensayo 1. **(a)** Tiempo de fermentación de 140h, **(b)** Acotación de la gráfica, hasta el tiempo de fermentación de 30h

Nota:

Rn: replicas; **CP:** Con pretratamiento térmico 85°C-15min; **SP:** Sin pretratamiento térmico; **B:** Blanco

Línea punteada: Tiempo de fermentación con el predominio de presiones máximas de biogás (16h).

De otro lado, es notable que el inóculo SP también registra valores de presión hasta de 52 mbar con un decaimiento posterior de la presión, conforme avanza el tiempo de fermentación (ver **Figura 37 b.**). Sin embargo, se resalta el hecho que la presión ejercida por el biogás en el LAA SP, luego del decaimiento anteriormente mencionado (similar a la condición CP en las primeras horas de fermentación), inicia una “recuperación” o fase creciente de presión entre las 85 y 90 h.

La fase creciente de presión del LAA SP, pudo no estar vinculada con la producción de Biogás*H₂, en primer instancia porque el pretratamiento térmico tuvo un efecto inhibitorio en la AME del LAA (relacionado con presiones más bajas respecto a la AME del inóculo SP, ver **Figura 38a**), y en segundo lugar, porque el LAA SP, luego de 90h de fermentación hasta finalizar el ensayo (140h), tuvo presiones de biogás comparables con el comportamiento de la AME (ver **Figura 38 b**) indicando que a partir de ese tiempo de fermentación (superiores a 90 h) predominan los procesos de metanogénesis sobre los de fermentación como ha sido evidenciado por diferentes autores como (Barrios, 2015).

De otro lado, el decaimiento de la presión anteriormente mencionado, pudo estar asociado a la dinámica de absorción del CO₂ inicial en la fase líquida y gaseosa por parte del absorbente acoplado a cada reactor (NaOH), y a la actividad microbiológica asociada al consumo de CO₂ e H₂ correspondiente a posibles procesos de homoacetogénesis, como ha sido discutido en capítulos anteriores.

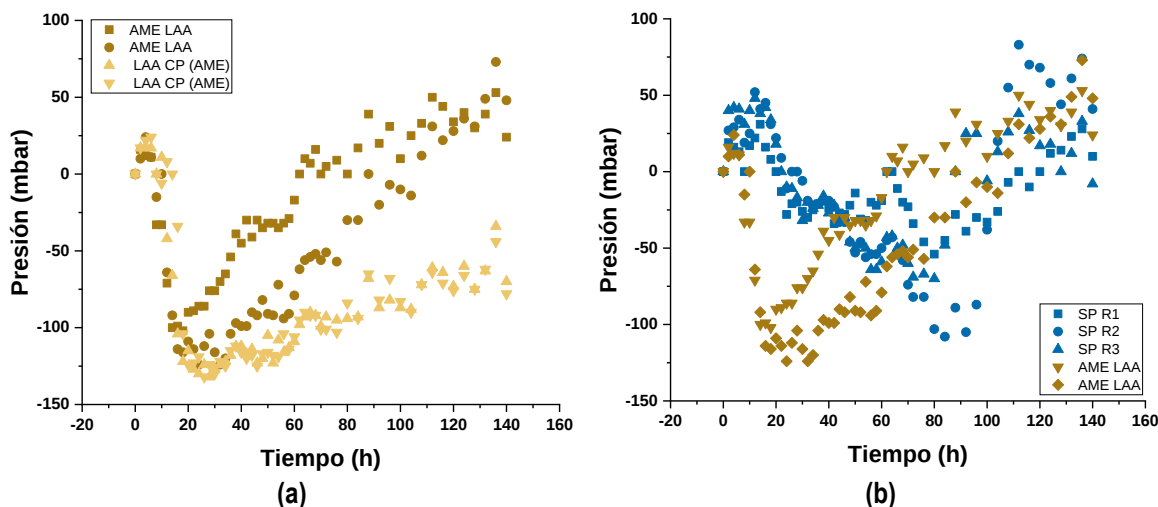


Figura 38. (a) AME del LAA CP y SP, **(b)** Comparación grafica de la presión ejercida por el biogás en la AME y en la FO del LAA SP.

5.2.3 Estimación de la producción de H₂ a través de la FO del ARY

Los bajos valores de presión ejercida por el biogás, denotan una baja producción volumétrica en la FO del ARY utilizando el LAA como inóculo (ver **Figura 39**), y puede considerarse que no existen diferencias pronunciadas entre la condición con y sin pretratamiento térmico del inóculo utilizado debido a que en promedio, la producción máxima estimada fue de 16,6 y 10,4 mL Biogás para la condición CP y SP respectivamente como se muestra en la **Tabla 23**. Lo anteriormente mencionado se hace más evidente teniendo en cuenta que la producción potencial del LAA sometido a un pretratamiento térmico a 85°C-15min, es del orden de los 600 mL (con la misma relación Sustrato: Lodo).

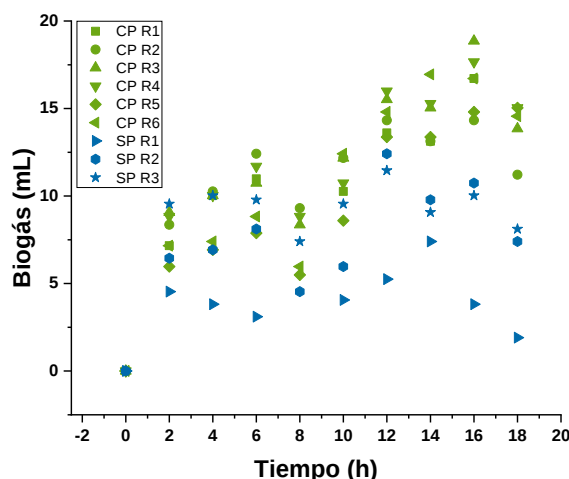


Figura 39. Producción de Biogás*H₂ estimada para el LAA con y sin pretratamiento térmico – Ensayo 1.

Tabla 23. Producción máxima de Biogás*H₂ estimada en la FO del ARY, Ensayo 1

Condición evaluada	ENSAYO 1	
	Reactor	Producción máxima de Biogás*H ₂ (mL)
Inóculo Pretratado (85°C-15min)	CP R1	16,7
	CP R2	14,3
	CP R3	18,9
	CP R4	17,7
	CP R5	15,0
	CP R6	16,9
	PROMEDIO	16,6
Inóculo Sin Pretratamiento	SP R1	7,4
	SP R2	12,4
	SP R3	11,5
	PROMEDIO	10,4

Como se describe en la metodología, se realizó un segundo ensayo o “Ensayo confirmatorio” de FO del ARY con el objetivo de corroborar la producción de biogás bajo las condiciones evaluadas, incluyendo reactores sin el acople de un absorbente de CO₂ (Identificados con las letras NABS), de tal manera que permita identificar la presión ejercida por el biogás sin el efecto de la dinámica de absorción (dinámica que arroja descensos pronunciados de la presión ejercida por el biogás).

La **Figura 40** muestra la presión y el volumen estimado de biogás correspondiente al “Ensayo confirmatorio”. La FO del ARY en este segundo ensayo tuvo en promedio, una producción máxima estimada de 14,8mL y 8,2mL para la condición CP y SP del inóculo respectivamente (ver **Tabla 24**), confirmando la baja productividad en ambas condiciones evaluadas, aun cuando el sustrato presentó un contenido mayor de carbohidratos respecto al Ensayo 1, manteniendo la misma relación Sustrato:Inóculo (ver **Tabla 22**). De otro lado, para las condiciones sin la adición de un absorbente de CO₂, fue evidente un decaimiento menos pronunciado de la presión respecto a lo observado en el Ensayo 1, confirmando que dicho decaimiento está relacionado predominantemente con la absorción de CO₂ generado durante el proceso de FO y del CO₂ atmosférico en la fase gaseosa y/o líquida que pudo estar remanente en cada reactor desde el inicio del ensayo. Así mismo, el

leve descenso de la presión observada sin el absorbente, puede atribuirse a la asimilación del H_2 en rutas metabólicas correspondientes a procesos como el de homoacetogénesis.

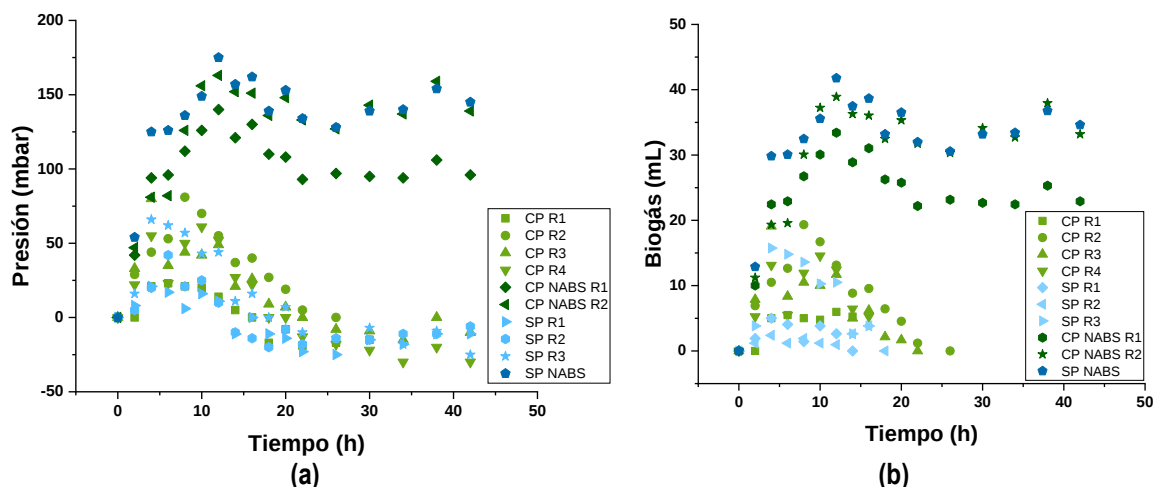


Figura 40. (a) Comportamiento de la presión ejercida por el biogás en la FO del ARY en el Ensayo 2. **(b)** producción estimada de biogás para las condiciones evaluadas.

Nota:

CP NABS Rn: LAA pretratado a 85°C-15 min , sin el acople de un absorbente de CO_2 , replica n

SP NABS: LAA Sin Pretratamiento, sin el acople de un absorbente de CO_2

Tabla 24. Producción máxima de Biogás* H_2 estimada en la FO del ARY, Ensayo confirmatorio

Condición evaluada	ENSAYO CONFIRMATORIO	
	Reactor	Producción máxima de Biogás* H_2 (mL)
Inóculo Pretratado (85°C-15min)	CP R1	6
	CP R2	19,3
	CP R3	19,1
	CP R4	14,6
	PROMEDIO	14,8
Inóculo Sin Pretratamiento	SP R1	5
	SP R2	3,8
	SP R3	15,8
	PROMEDIO	8,2

La composición del biogás para las muestras representativas evaluadas en el Ensayo 1 y en el Ensayo 2, se muestra en la **Tabla 25**. El biogás producido a través de la FO del ARY en un tiempo de fermentación de 16h, está compuesto en su totalidad por H_2 , siendo consistente con el comportamiento de la presión ejercida por el mismo en las primeras horas de fermentación. De otro lado, para mayores tiempos de fermentación, del orden de 42 h, el biogás está compuesto predominantemente por CO_2 (para ambas condiciones, CP y SP), siendo consistente con el decaimiento de la presión cuando se acopla un absorbente de este biogás. No se detectó metano en las primeras 42h de FO del ARY, utilizando tanto el LAA CP como sin pretratamiento, lo cual pudo relacionarse con el tipo de sustrato (alto contenido de carbohidratos) y al tiempo de fermentación correspondiente a la toma de muestra (42h), en el cual aún no inician los posibles procesos de metanogénesis (como el caso del LAA SP).

Tabla 25. Composición del Biogás en la FO del ARY

Condición Evaluada	Reactor	Tiempo de Fermentación Representativo	%H ₂	%CO ₂	%CH ₄
LAA Pretratado (Ensayo 1)	CP R1	16h	100	ND	ND
LAA Pretratado. Sin el acople de Absorbente de CO ₂ (Ensayo 2)	CP NABS R1	42h	2,2	97,8	ND
	CP NABS R2	42h	3,2	96,9	ND
LAA SP. Sin el acople de Absorbente de CO ₂ (Ensayo 2)	SP NABS	42h	2,1	97,9	ND
ND: Por debajo del límite de detección					

5.2.4 Características de la fase líquida en la FO del ARY y rendimiento de producción de H₂

La **Tabla 26** muestra la caracterización fisicoquímica de la fase líquida en la FO del ARY de acuerdo con el Ensayo 1. Se observa que a las 16h de fermentación (en el cual se produce la mayor cantidad de H₂ según la caracterización de la fase gaseosa y el comportamiento de la presión), la reducción de carbohidratos se estima en 76%, valor porcentual que aumenta a 90,2% en las 48h de fermentación. La reducción de DQO en las primeras 48h no superó el 50%, siendo consistente con los procesos de FO, en la cual no hay una mineralización completa del sustrato, ya que una fracción de este es transformado a otros compuestos que aportan DQO a la fase líquida como los AGVs.

Tabla 26. Características de la fase líquida en la FO del ARY, utilizando LAA pretratado

Condición Evaluada	Toma de muestra	pH Final	Reducción DQO (%)	Reducción Carbohidratos Totales (%)	AGVs (mg.L ⁻¹)
FO ARY, LAA Pretratado	16h	4,21	42,2	76,0	348,7
	48h	4,25	46,4	90,2	289,9
	140h	4,32	62,2	96,1	307,4
FO ARY, LAA SP	140h	4,66	35,4	95,4	385,4

Es evidente el rápido descenso del pH (4,21 Unidades) y ausencia de alcalinidad desde las primeras 16h de fermentación, asociado principalmente a la producción de AGVs (Cappelletti et al., 2011), los cuales aumentan de 160 mg.L⁻¹ (correspondientes al ARY utilizada como sustrato) a 348,7 aproximadamente. No obstante, no se observa un incremento de los AGVs conforme avanza el tiempo de fermentación, confirmado el predominio de otras rutas metabólicas no asociadas con la producción de H₂, como es el caso de la producción de alcoholes o la fermentación ácido láctica.

De otro lado, la FO del ARY utilizando como inóculo el LAA sin pretratamiento, finalizado el tiempo de fermentación de 140 h, registró una reducción de carbohidratos del 95,4% similar a la registrada cuando no es sometido a pretratamiento, no obstante, se evidencia una mayor reducción respecto a la DQO, lo cual puede asociarse a que bajo ese tiempo de fermentación y a pesar de los bajos valores de pH, pueden ocurrir procesos de mineralización del sustrato o de los metabolitos producidos en las primeras horas de fermentación, como es

el caso de la metanogénesis, siendo consistente con lo expuesto en el comportamiento de la presión ejercida por el biogás a partir de las 90h.

Conforme a lo anterior, se estima que la FO del ARY utilizando LAA pretratado térmicamente (85°C-15min) y sin pretratamiento, produce en promedio 16,6 y 10,4 mL respectivamente (ver **Tabla 23**) con una reducción del sustrato aproximada del 76%. De esta manera, la FO del ARY bajo las condiciones del presente estudio, tuvo un rendimiento en la producción de H₂ hasta de 30 y 19 mL.(gGlucosa_{Removida})⁻¹ (equivalente a 0,22 y 0,14 molH₂.(molGlucosa_{Removida})⁻¹) utilizando LAA pretratado térmicamente y sin pretratamiento respectivamente. En ese sentido, teniendo en cuenta que la producción potencial de H₂ del LAA pretratado a 85°C-15min es de 289 mLBiogás*H₂.(gGlucosa_{Removida})⁻¹, es posible inferir que la producción de H₂ a través de la FO del ARY bajo las condiciones del presente estudio es baja (10,5% de la producción potencial y 5,6% respecto al rendimiento teórico de 4 moles por mol de glucosa).

El rendimiento de H₂ encontrado en el presente estudio, es inferior al reportado por autores como Cappelletti, et al. (2011), cuyo proceso de FO del ARY alcanzó un rendimiento hasta de 2,41 molH₂*(molGlucosa_{Removida})⁻¹ bajo condiciones similares como el tiempo de fermentación (entre 10 y 20h) y la DQO adicionada (5g.L⁻¹). Sin embargo, es posible identificar algunos factores que pudieron favorecer la producción de H₂ en ese estudio; uno de ellos radica en que los autores utilizaron como inóculo, un cultivo puro de *Clostridium acetobutylicum*, microorganismo ampliamente reconocido por ser BPH y en ese sentido se pudieron favorecer rutas metabólicas específicas de producción de este biogás sin las implicaciones de otras rutas metabólicas con producción nula de H₂ o consumo del mismo, como puede ocurrir cuando se utilizan cultivos mixtos (Ghimire et al., 2015; Pendyala et al., 2012). De igual forma, los autores mencionados adicionaron macro y micronutrientes que pudieron fomentar la actividad enzimática del *Clostridium acetobutylicum* (C Y Lin & Lay, 2005) y efectuaron los ensayos a una temperatura ligeramente superior (36°C) que de cierta manera, pudo aumentar la cinética de degradación y transformación del sustrato (Sinha & Pandey, 2011).

Para el presente estudio, considerando la adición de sustrato con un mínimo de 2.317mg.L⁻¹ de DQO, se tiene un rendimiento estimado de 17,8mLH₂.(gDQO_{adicionada})⁻¹, menor al rendimiento encontrado en estudios locales como el de Yela & Peña, (2015), quienes utilizando la misma relación Sustrato:Inóculo (2gDQO:gSSV) y un mismo pH inicial, obtuvieron un valor de este parámetro de 24,93 mLH₂.(mLH₂.(gDQO_{adicionada})⁻¹). Esta diferencia puede estar asociada al tipo de inóculo utilizado, el cual fue de tipo granular, que ha sido utilizado ampliamente en la DA del ARY (Jijai et al., 2015; Torres et al., 2007) y que tiene características bioquímicas favorables para la FO anteriormente descritas en el presente documento.

Así mismo, el bajo rendimiento de H₂ en relación con la producción potencial del LAA sugiere la influencia de otros factores sobre la FO del ARY. Al respecto, autores como (Gomes, Fuess, Mañunga, De Lima Gomes, & Zaiat, 2016), encontraron poca o nula producción de H₂ a través de la FO del ARY, aun con una reducción de carbohidratos superiores al 90%, lo cual lo asociaron a la presencia de bacteriocinas indicadoras de la presencia de bacterias ácido lácticas. En ese sentido, el ARY en el presente estudio pudo contener bacterias ácido lácticas que pudieron competir con el sustrato (con las BPH) y favorecer la aparición de otras rutas metabólicas en la transformación de carbohidratos con la producción nula de H₂ (Baghchehsaraee et al., 2008; Noike, Takabatake, Mizuno, & Ohba, 2002; Rosa, Gomes, Varesche, & Silva, 2016).

6 CONCLUSIONES

Desde el punto de vista de las características del inóculo y el efecto del pretratamiento térmico sobre la cinética de los microorganismos presentes en él (estimada a través de la producción de biogás y ajustada mediante el modelo de Gompertz), se concluye que:

- Aunque la relación SSV/SST como medida indirecta del contenido de biomasa viable en los inóculos, pudo estar influenciada por el contenido de residuos u otros materiales en cada inóculo o cuantificar en cierta medida biomasa inactiva o “muerta”, los ensayos de AME confirmaron una mayor actividad biológica del LAGM y del LAA frente al LAF, con valores de 0,40, 0,05 y 0,01 gDQO.CH₄.(gSSV.d)⁻¹ respectivamente.
- El LAGM y el LAA tienen la capacidad de producir Biogás*H₂ sin un tratamiento previo del inóculo, sugiriendo la participación de otros factores en la AHE de este tipo de inóculos, como la fuente de origen y la diversidad microbiológica de los mismos, así como el pH del medio de reacción y el sustrato utilizado.
- Para el LAGM, el mayor valor de producción acumulada máxima de Biogás*H₂ - P (en promedio 665,1 mL bajo 75°C-45min) ocurrió con un porcentaje de reducción del sustrato estimado de 85,4%. Aunque este porcentaje se encuentra dentro de lo reportado en la literatura (utilizando sustratos como la glucosa) y en ese sentido indica la capacidad de este inóculo en transformarla a Biogás*H₂ (y AGVs), la tasa en la cual se efectuó puede considerarse como baja (R_m: Hasta 8,0 mLBiogás.h⁻¹) si se compara con el correspondiente al LAA para la condición de mayor productividad (29,2 mLBiogás.h⁻¹). El relativo bajo valor de R_m para la mayor P en el LAGM, se traduce en curvas de producción de Biogás*H₂ con una tendencia creciente (pero con pendientes bajas) más allá del tiempo de fermentación.
- El mayor valor de P para el LAA (en promedio 564,9 mL bajo 85°C-15min) ocurrió con una reducción estimada del 97,8% del sustrato. Esto indica la capacidad del LAA en transformar este carbohidrato en Biogás*H₂ (y AGVs) predominantemente y a una alta tasa (R_m: Hasta 29,2 mLBiogás.h⁻¹).
- Para el LAGM, el pretratamiento térmico del inóculo, solo potencializa la producción de Biogás*H₂ para una condición específica (75°C-45min), mostrando un efecto en cierta medida desfavorable para las demás condiciones evaluadas de T y t si se compara con la producción potencial del LAGM SP.
- El pretratamiento térmico del LAF, potencializa hasta un 53% la producción potencial de Biogás*H₂; no obstante, este inóculo presenta los valores más bajos de P, lo cual puede relacionarse con su diversidad microbiológica y su fuente de origen.

De otro lado, el efecto del pretratamiento térmico sobre el rendimiento de la producción potencial de H₂ en los inóculos y su selección en la FO del ARY, se concluye que:

- El ARY utilizada en el presente estudio tuvo características fisicoquímicas dentro del rango típico registrado en el contexto local para este tipo de AR agroindustrial, con DQO y carbohidratos totales hasta de 5.103 y 4.570 mg.L⁻¹ respectivamente y bajos valores de pH del orden de 4,4 y 4,7 Unidades. Lo anterior permite confirmar al ARY como potencialmente factible para ser usada como sustrato en la producción de H₂ a través de la FO.
- El LAGM y el LAA con y sin pretratamiento térmico son factibles para ser utilizados como inóculo en ensayos de FO de sustratos complejos como el ARY, de conformidad con los valores de Rendimiento

de Biogás – Y ($\text{mL Biogás} \cdot \text{H}_2 / (\text{g Glucosa}_{\text{Removida}} \cdot \text{h})^{-1}$) y Actividad Hidrogenónica Especifica – AHE ($\text{mL Biogás} \cdot \text{H}_2 / (\text{g SSV}_{\text{Inicial}} \cdot \text{h})^{-1}$). El LAGM y el LAA presentan mayores valores promedio de Y respecto al LAF, según las condiciones de pretratamiento térmico evaluadas. Estos valores son en su orden, para los seis valores más altos correspondientes a: (i) 289,0 (LAA 85°C-15min), (ii) 286,9 (LAA 75°C-15min), (iii) 277,0 (LAGM 75°C-45min), (iv) 276,7 (LAGM SP), (v) 269,7 (LAGM 75°C-30min) y (vi) 244,6 (LAA 85°C-30min).

- En cuanto a la AHE ($\text{mL Biogás} \cdot \text{H}_2 / (\text{g SSV}_{\text{Inicial}} \cdot \text{h})^{-1}$), los valores promedio son en su orden: (i) 27,3 (LAF 100°C-45min), (ii) 24,9 (LAA 85°C-15min), (iii) 23,8 (LAA 100°C-30min), (iv) 22,4 (LAF SP), (v) 18,8 (LAA 75°C-30min), (vi) 18,0 (LAA 85°C-30min), destacándose que el LAF presenta el valor más alto de AHE, aunque su rendimiento de producción de biogás fue menor que el del LAGM y el LAA, indicando que no necesariamente existe una proporcionalidad ente estos dos parámetros, cuando se evalúan diferentes inóculos.
- El pretratamiento térmico a una temperatura de 85°C durante un tiempo de exposición de 15min, tiene un efecto positivo en el rendimiento de producción de biogás y la AHE del LAA. Lo anterior, sumado a su alta relación SV/ST (0,83), alta capacidad en la transformación de carbohidratos (eficiencias de reducción predominantes del orden del 98%) y parámetros cinéticos, lo hacen factible para ser utilizado como inóculo en la estimación de la producción potencial de H_2 en la FO del ARY, aun sin someterlo a un tratamiento térmico previo.
- El rendimiento en la producción de H_2 en la FO del ARY fue de 30 y 19 $\text{mL} \cdot (\text{g Glucosa}_{\text{Removida}})^{-1}$ (equivalente a 0,22 y 0,14 $\text{mol H}_2 \cdot (\text{mol Glucosa}_{\text{Removida}})^{-1}$) utilizando LAA pretratado térmicamente a 85°C-15min y sin pretratamiento respectivamente, lo cual representa hasta un 10,5% de su producción potencial de H_2 . El bajo rendimiento de H_2 en relación con la producción potencial del LAA sugiere la influencia de otros factores sobre la FO del ARY que direccionan rutas metabólicas con producción nula de este biogás, como la posible presencia de bacterias ácido lácticas.

7 RECOMENDACIONES

En estudios relacionados con la aplicación de la AHE como herramienta para la selección de inóculos, se recomienda:

- Realizar los ensayos de AHE con la liberación continua de la presión ejercida por el biogás, de tal manera que se garanticen presiones bajas de H_2 en la fase líquida con la consecuente capacidad de oxidación de NADH por NADH:FdOxidoreductasa en las BPH.
- Caracterizar los subproductos generados en la fase líquida como los AGVs, de tal manera que permitan identificar las rutas metabólicas predominantes en la producción de H_2 , utilizando los inóculos evaluados en el presente estudio y un sustrato fácilmente biodegradable como la glucosa o un sustrato complejo como el ARY.
- Evaluar otras magnitudes de T y t para el pretratamiento térmico de inóculos provenientes de sistemas de tratamiento de agua residual doméstica y/o municipal como el LAF.
- Realizar la caracterización microbiológica de la fase líquida en la FO del ARY, a diferentes tiempos de fermentación, de tal manera que se puedan establecer asociaciones entre los metabolitos generados, el rendimiento en la producción de H_2 y los microorganismos productores y/o consumidores de este biogás y de esta manera, establecer estrategias para maximizar el proceso, como el pretratamiento del sustrato además del inóculo per se.
- Realizar ensayos de AHE con adición de sustrato repetitiva una vez finalizado el tiempo de fermentación, con el objetivo de evaluar la influencia del sustrato sobre parámetros cinéticos asociados a la producción de H_2 , como Lambda (λ) y Rm.
- Realizar estudios que permitan determinar la viabilidad económica del pretratamiento térmico del inóculo para la producción de H_2 a través de la FO del ARY.
- Realizar estudios que permitan evaluar la producción conjunta de H_2 y CH_4 a partir de la DA del ARY, de tal manera que permita aumentar la reducción del contenido de materia orgánica de este residuo agroindustrial, maximizar su potencial para la generación de bioenergía y aportar criterios de decisión respecto a la viabilidad técnico-económica para dicho objetivo.

8 REFERENCIAS

- Abas, N., Kalair, A., & Khan, N. (2015). Review of fossil fuels and future energy technologies. *Futures*, 69, 31–49. <https://doi.org/10.1016/j.futures.2015.03.003>
- Abdalla, A. M., Hossain, S., Nisfindy, O. B., Azad, A. T., Dawood, M., & Azad, A. K. (2018). Hydrogen production, storage, transportation and key challenges with applications: A review. *Energy Conversion and Management*, 165, 602–627. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.03.088>
- Abreu, A. A., Alves, J. I., Pereira, M. A., Karakashev, D., Alves, M. M., & Angelidaki, I. (2010). Engineered heat treated methanogenic granules: A promising biotechnological approach for extreme thermophilic biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 101(24), 9577–9586. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.070>
- Acar, C., & Dincer, I. (2014). Comparative assessment of hydrogen production methods from renewable and non-renewable sources. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.10.060>
- Agarwal, A. K. (2007). Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science*, 33(3), 233–271. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2006.08.003>
- Agencia Internacional de la Energía - AIE. (2015). *Technology Roadmap Hydrogen and Fuel Cells*. Paris. Retrieved from www.iea.org/t&c/
- Agencia Internacional de la Energía - AIE. (2017a). *Global Trends and Outlook for Hydrogen*. IEA Hydrogen. Retrieved from http://ieahydrogen.org/pdfs/Global-Outlook-and-Trends-for-Hydrogen_Dec2017_WEB.aspx
- Agencia Internacional de la Energía - AIE. (2017b). Key world energy statistics. *Key World Energy Statistics*, 1–80. <https://doi.org/10.1787/22202811>
- Akutsu, Y., Lee, D. Y., Li, Y. Y., & Noike, T. (2009). Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heat-pretreated natural microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(13), 5365–5372. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.04.052>
- Akutsu, Y., Li, Y.-Y., Harada, H., & Yu, H.-Q. (2009). Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.01.048>
- Alarcón, F., & Dufour, M. D. (1998). *Almidón Agrio de Yuca en Colombia Tomo 1: Producción y Recomendaciones*. Retrieved from https://www.clayuca.org/sitio/images/publicaciones/almidon_agrio_tomo_1.pdf
- Algayyim, S. J. M., Wandel, A. P., Yusaf, T., & Hamawand, I. (2018). Production and application of ABE as a biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 1195–1214. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.09.082>
- Alibardi, L., & Cossu, R. (2016). Effects of carbohydrate, protein and lipid content of organic waste on hydrogen production and fermentation products. *Waste Management*, 47, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.07.049>
- Alibardi, L., Favaro, L., Lavagnolo, M. C., Basaglia, M., & Casella, S. (2012). Effects of heat treatment on microbial communities of granular sludge for biological hydrogen production. *Water Science and Technology*, 66(7), 1483–1490. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.336>
- Alvarado, A., Montañez-Hernández, L. E., Palacio-Molina, S. L., Oropeza-Navarro, R., Luévanos-Escareño, M. P., & Balagurusamy, N. (2014). Microbial trophic interactions and mcrA gene expression in monitoring of

- anaerobic digesters. *Frontiers in Microbiology*, 5, 597. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00597>
- Amani, T., Nosrati, M., & Sreekrishnan, T. R. (2010). Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects — a review. *Environmental Reviews*, 18(NA), 255–278. <https://doi.org/10.1139/A10-011>
- Angelidaki, I., Borzacconi, L., Kalyuzhnyi, S., Guwy, A. J., van Lier, J. B., Alves, M., ... Jenicek, P. (2009). Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*, 59(5), 927–934. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.040>
- Angenent, L. T., Karim, K., Al-Dahhan, M. H., Wrenn, B. A., & Domínguez-Espinosa, R. (2004). Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends in Biotechnology*, 22(9), 477–485. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.07.001>
- Antonopoulou, G., Gavala, H. N., Skiadas, I. V., Angelopoulos, K., & Lyberatos, G. (2007a). Biofuels generation from sweet sorghum: Fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.048>
- Antonopoulou, G., Gavala, H. N., Skiadas, I. V., Angelopoulos, K., & Lyberatos, G. (2007b). Biofuels generation from sweet sorghum: Fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.048>
- APHA. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington D. C.: American Public Health Association.
- Appels, L., Baeyens, J., Degreè, J., & Dewil, R. (2008). Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.06.002>
- Aquino, S. F., Chernicharo, C. A. L., De, M., Florêncio, L., Santos, D., & Monteggia, L. O. (2007). METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE METANOGENICA ESPECÍFICA (AME) EM LODOS ANAERÓBIOS METHODOLOGIES FOR DETERMINING THE SPECIFIC METHANOGENIC ACTIVITY (SMA) IN ANAEROBIC SLUDGES, 192–201. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/esa/v12n2/a10v12n2.pdf>
- Arimi, M. M., Knodel, J., Kiprop, A., Namango, S. S., Zhang, Y., & Geißen, S. U. (2015). Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: A review. *Biomass and Bioenergy*. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.02.011>
- Arizzi, M., Morra, S., Pugliese, M., Gullino, M. L., Gilardi, G., & Valetti, F. (2016). Biohydrogen and biomethane production sustained by untreated matrices and alternative application of compost waste. *Waste Management*, 56, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.06.039>
- Azbar, N. (2015). Fundamentals of Hydrogen Production via Biotechnology (Bio-H₂). In *Phytoremediation for Green Energy* (pp. 149–173). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7887-0_11
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., & Margaritis, A. (2009). Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 2573–2579. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.01.010>
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., Margaritis, A., & Reid, G. (2008). The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(15), 4064–4073. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.069>

- Barrios, J. D. (2015). *Influencia del pH sobre la producción biológica de hidrógeno a partir de agua residual agroindustrial*. Universidad del Valle. Retrieved from <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/xmlui/handle/10893/8977>
- Bartels, J. R., Pate, M. B., & Olson, N. K. (2010). An economic survey of hydrogen production from conventional and alternative energy sources. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(16), 8371–8384. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.04.035>
- Bauer, N., Hilaire, J., Brecha, R. J., Edmonds, J., Jiang, K., Kriegler, E., ... Sferri, F. (2016). Assessing global fossil fuel availability in a scenario framework. *Energy*, 111, 580–592. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.05.088>
- Baykara, S. Z. (2018). Hydrogen: A brief overview on its sources, production and environmental impact. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(23), 10605–10614. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.02.022>
- Bharathiraja, B., Sudharsana, T., Bhargavi, A., Jayamuthunagai, J., & Praveenkumar, R. (2016). Biohydrogen and Biogas – An overview on feedstocks and enhancement process. *Fuel*, 185, 810–828. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.08.030>
- Bhatia, S. K., Kim, S. H., Yoon, J. J., & Yang, Y. H. (2017). Current status and strategies for second generation biofuel production using microbial systems. *Energy Conversion and Management*, 148, 1142–1156. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.06.073>
- Bičáková, O., & Straka, P. (2012). Production of hydrogen from renewable resources and its effectiveness. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(16), 11563–11578. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.05.047>
- Blanco Londoño, S. A., & Rodríguez Chaparro, T. (2012). Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura: una revisión crítica (1993-2011). *Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería*, 20(3), 398–411. <https://doi.org/10.4067/S0718-33052012000300014>
- Bong, C. P. C., Lim, L. Y., Lee, C. T., Klemenš, J. J., Ho, C. S., & Ho, W. S. (2018). The characterisation and treatment of food waste for improvement of biogas production during anaerobic digestion – A review. *Journal of Cleaner Production*, 172, 1545–1558. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.199>
- Boodhun, B. S. F., Mudhoo, A., Kumar, G., Kim, S. H., & Lin, C. Y. (2017). Research perspectives on constraints, prospects and opportunities in biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(45), 27471–27481. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.04.077>
- Braguglia, C. M., Gallipoli, A., Gianico, A., & Pagliaccia, P. (2018). Anaerobic bioconversion of food waste into energy: A critical review. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.145>
- Bundhoo, M. A. Z., & Mohee, R. (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. In *International Journal of Hydrogen Energy* (Vol. 41, pp. 6713–6733). <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>
- Bundhoo, M. A. Z., Mohee, R., & Hassan, M. A. (2015). Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. *Journal of Environmental Management*, 157, 20–48. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.04.006>
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J. P., Ruiz-Filippi, G., & Trably, E. (2017). Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(2), 158–181. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw043>

- Cai, G., Jin, B., Monis, P., & Saint, C. (2011). Metabolic flux network and analysis of fermentative hydrogen production. *Biotechnology Advances*, 29(4), 375–387. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.02.001>
- Cajigas, A., Pérez, A., & Torres, P. (2005). Importancia del pH y la alcalinidad en el tratamiento anaerobio de las aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca. *Csientia et Technica*, XI(27), 243–248. <https://doi.org/0122-1701>
- Campos, J. R. (1999). Tratamento de Esgotos Sanitários por Processo Anaeróbico e Disposição Controlada no Solo. In *Prosab* (p. 436). Retrieved from <https://www.finep.gov.br/images/apoio-e-financiamento/historico-de-programas/prosab/prosabcamposfinal.pdf>
- Cappelletti, B. M., Reginatto, V., Amante, E. R., & Antônio, R. V. (2011). Fermentative production of hydrogen from cassava processing wastewater by *Clostridium acetobutylicum*. *Renewable Energy*, 36(12), 3367–3372. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.05.015>
- Carvalho, M., Cassidy, J., Ribeiro, J. M., Oliveira, B. A., Freitas, E. B., Roca, C., ... Reis, M. A. M. (2018). Performance of a two-stage anaerobic digestion system treating fruit pulp waste: The impact of substrate shift and operational conditions. *Waste Management*, 78, 434–445. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.06.013>
- Castellano-Hinojosa, A., Armato, C., Pozo, C., González-Martínez, A., & González-López, J. (2018). New concepts in anaerobic digestion processes: recent advances and biological aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(12), 5065–5076. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9039-9>
- Chang, S., Li, J., Liu, F., & Yu, Z. (2012). Effect of different gas releasing methods on anaerobic fermentative hydrogen production in batch cultures. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 6(6), 901–906. <https://doi.org/10.1007/s11783-012-0403-1>
- Chang, S., Li, J. Z., & Liu, F. (2011). Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. *Renewable Energy*, 36(5), 1517–1522. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2010.11.023>
- Chen, X., Lv, Y., Liu, Y., Ren, R., & Zhao, J. (2017). The hydrogen production characteristics of mixed photoheterotrophic culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(8), 4840–4847. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.155>
- Cheong, D. Y., & Hansen, C. L. (2006). Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(4), 635–643. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0313-x>
- Chernicharo, C. A. (2007). *Biological Wastewater Treatment Vol.4: Anaerobic Reactors. Biological wastewater treatment in warm climate regions* (Vol. 04). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Chynoweth, D. P., Owens, J. M., & Legrand, R. (2000). Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. *Renewable Energy*, 22(1–3), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0960-1481\(00\)00019-7](https://doi.org/10.1016/S0960-1481(00)00019-7)
- Colin, X., Farinet, J. L., Rojas, O., & Alazard, D. (2007). Anaerobic treatment of cassava starch extraction wastewater using a horizontal flow filter with bamboo as support. *Bioresource Technology*, 98(8), 1602–1607. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.06.020>
- Corneli, E., Dragoni, F., Adessi, A., De Philippis, R., Bonari, E., & Ragaglini, G. (2016). Energy conversion of biomass crops and agroindustrial residues by combined biohydrogen/biomethane system and anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 211, 509–518. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.134>
- Correa, D. F., Beyer, H. L., Possingham, H. P., Thomas-Hall, S. R., & Schenk, P. M. (2017). Biodiversity impacts

- of bioenergy production: Microalgae vs. first generation biofuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 74, 1131–1146. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.02.068>
- Cowley, C., & Brorsen, B. W. (2018). Anaerobic Digester Production and Cost Functions. *Ecological Economics*, 152, 347–357. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2018.06.013>
- Das, D., Khanna, N., & Dasgupta, C. N. (2017). *Biohydrogen production: fundamentals and technology advances*.
- Das, D., & Veziroğlu, T. N. (2001). Hydrogen production by biological processes: A survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26(1), 13–28. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(00\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(00)00058-6)
- Davila-Vazquez, G., Alatríste-Mondragón, F., de León-Rodríguez, A., & Razo-Flores, E. (2008). Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19), 4989–4997. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.06.065>
- Davila-Vazquez, G., de León-Rodríguez, A., Alatríste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2011). The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. *Biomass and Bioenergy*, 35(7), 3174–3181. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.04.046>
- De Gioannis, G., Muntoni, A., Poletti, A., Pomi, R., & Spiga, D. (2017). Energy recovery from one- and two-stage anaerobic digestion of food waste. *Waste Management*, 68, 595–602. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.06.013>
- De Sá, L. R. V., Cammarota, M. C., De Oliveira, T. C., Oliveira, E. M. M., Matos, A., & Ferreira-Leitão, V. S. (2013). Pentoses, hexoses and glycerin as substrates for biohydrogen production: An approach for Brazilian biofuel integration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(7), 2986–2997. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.12.103>
- De Sá, L. R. V., De Oliveira, T. C., Dos Santos, T. F., Matos, A., Cammarota, M. C., Oliveira, E. M. M., & Ferreira-Leitão, V. S. (2011). Hydrogenase activity monitoring in the fermentative hydrogen production using heat pretreated sludge: A useful approach to evaluate bacterial communities performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13), 7543–7549. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.119>
- Dessi, P., Porca, E., Frunzo, L., Lakaniemi, A. M., Collins, G., Esposito, G., & Lens, P. N. L. (2018). Inoculum pretreatment differentially affects the active microbial community performing mesophilic and thermophilic dark fermentation of xylose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(19), 9233–9245. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.03.117>
- Dessi, P. D., Porca, E., Waters, N. R., Lakaniemi, A.-M., Collins, G., & Lens, P. N. L. (2018). Thermophilic versus mesophilic dark fermentation in xylose-fed fluidised bed reactors: Biohydrogen production and active microbial community. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43, 5473–5485. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.158>
- Díaz-Baez, M. C., Espitia Vargas, S. E., & Molina Perez, F. (2002). *Digestión Anaerobia, una aproximación a la tecnología*. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from http://www.bdigital.unal.edu.co/43178/2/9587011961_Parte_1.pdf
- Dimitriou, P., & Tsujimura, T. (2017). A review of hydrogen as a compression ignition engine fuel. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.07.232>
- Dincer, I., & Acar, C. (2014). Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(34), 11094–11111. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.12.035>

- Dinesh, G. K., Chauhan, R., & Chakma, S. (2018). Influence and strategies for enhanced biohydrogen production from food waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.009>
- Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S., & Longlong, M. (2010). Evaluation of pretreatment methods on harvesting hydrogen producing seeds from anaerobic digested organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(15), 8234–8240. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.12.058>
- Duan, Z., Cruz Bournazou, M. N., & Kravaris, C. (2017). Dynamic model reduction for two-stage anaerobic digestion processes. *Chemical Engineering Journal*, 327, 1102–1116. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.110>
- Elbeshbishy, E., Dhar, B. R., Nakhla, G., & Lee, H. S. (2017). A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>
- Elbeshbishy, E., Hafez, H., Dhar, B. R., & Nakhla, G. (2011). Single and combined effect of various pretreatment methods for biohydrogen production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(17), 11379–11387. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.02.067>
- Ellabban, O., Abu-Rub, H., & Blaabjerg, F. (2014). Renewable energy resources: Current status, future prospects and their enabling technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, 748–764. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.113>
- Espinosa Chávez, B. (2007). *Evaluación del desarrollo de la actividad sulfatorreductora en un lodo granular metanogénico de diferentes tamaños*. INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C. Retrieved from <https://repositorio.ipicyt.edu.mx/bitstream/handle/11627/68/EspinosaChavez.pdf?sequence=1>
- Esquivel-Elizondo, S., Chairez, I., Salgado, E., Aranda, J. S., Baquerizo, G., & Garcia-Peña, E. I. (2014). Controlled continuous bio-hydrogen production using different biogas release strategies. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(7), 1737–1751. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0961-8>
- Estevam, A., Arantes, M. K., Andrigheto, C., Fiorini, A., Ant, E., Onio Da Silva, ^, & Jos E Alves, H. (2018). Production of biohydrogen from brewery wastewater using *Klebsiella pneumoniae* isolated from the environment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43, 4276–4283. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.052>
- Fagbohungebe, M. O., Herbert, B. M. J., Hurst, L., Ibeto, C. N., Li, H., Usmani, S. Q., & Semple, K. T. (2017). The challenges of anaerobic digestion and the role of biochar in optimizing anaerobic digestion. *Waste Management*. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.11.028>
- Fan, Y.-T., Zhang, G.-S., Guo, X.-Y., Xing, Y., & Fan, M.-H. (2006). Biohydrogen-production from beer lees biomass by cow dung compost. *Biomass and Bioenergy*, 30, 493–496. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2005.10.009>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00175-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00175-5)
- Fang, H. H. P., & Liu, H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*, 82(1), 87–93. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00110-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00110-9)
- Fernández, M., Abalos, A., Crombet, S., & Caballero, H. (2010). ENSAYOS DE BIODEGRADABILIDAD ANAEROBIA DE AGUAS RESIDUALES GENERADAS EN UNA PLANTA REFINADORA DE ACEITE DE

- SOJA. *Interciencia: Revista de Ciencia y Tecnología de América*, 35(8), 600–604. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3474202>
- Ferreira, L. R. A., Otto, R. B., Silva, F. P., De Souza, S. N. M., De Souza, S. S., & Ando Junior, O. H. (2018). Review of the energy potential of the residual biomass for the distributed generation in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94, 440–455. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.06.034>
- Foresti, E., Zaiat, M., & Vallero, M. (2006). Anaerobic processes as the core technology for sustainable domestic wastewater treatment: Consolidated applications, new trends, perspectives, and challenges. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 5(1), 3–19. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-4630-9>
- Fotidis, I. A., Karakashev, D., Kotsopoulos, T. A., Martzopoulos, G. G., & Angelidaki, I. (2013). Effect of ammonium and acetate on methanogenic pathway and methanogenic community composition. *FEMS Microbiology Ecology*, 83(1), 38–48. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01456.x>
- Gallegos - García, M., Celis, L., & Razo - Flores, E. (2010). COMPETENCIA POR SUSTRATO DURANTE EL DESARROLLO DE BIOMASA SULFATORREDUCTORA A PARTIR DE UN LODO METANOGÉNICO EN UN REACTOR UASB. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 26(2), 109–117.
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>
- Gomes, S. D., Fuess, L. T., Mañunga, T., De Lima Gomes, P. C. F., & Zaiat, M. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour wastewater in a continuous multiple tube reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(19), 8120–8131. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.11.186>
- Goux, X., Calusinska, M., Fossépré, M., Benizri, E., & Delfosse, P. (2016). Start-up phase of an anaerobic full-scale farm reactor - Appearance of mesophilic anaerobic conditions and establishment of the methanogenic microbial community. *Bioresource Technology*, 212, 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.040>
- Gu, Y., Chen, X., Liu, Z., Zhou, X., & Zhang, Y. (2014). Effect of inoculum sources on the anaerobic digestion of rice straw. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 158, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.011>
- Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Ne Carré, H., & Steyer, J.-P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>
- Hallenbeck, P. C. (2009). Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7379–7389. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.12.080>
- Hallenbeck, P. C., & Benemann, J. R. (2002). *Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes*. *International Journal of Hydrogen Energy* (Vol. 27). Retrieved from www.elsevier.com/locate/ijhydene
- Hallenbeck, P. C., & Ghosh, D. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology*, 27(5), 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.004>
- Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L., & Hussy, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimisation. In *International Journal of Hydrogen Energy* (Vol. 27, pp. 1339–1347). [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00090-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00090-3)
- Hawkes, Freda 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, 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.08.014>
- Hay, J. X. W., Wu, T. Y., Juan, J. C., & Md. Jahim, J. (2013). Biohydrogen production through photo fermentation or dark fermentation using waste as a substrate: Overview, economics, and future prospects of hydrogen usage. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 7(3), 334–352. <https://doi.org/10.1002/bbb.1403>
- Henrich, E., Dahmen, N., Dinjus, E., & Sauer, J. (2015, December 1). The role of biomass in a future world without fossil fuels. *Chemie-Ingenieur-Technik*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/cite.201500056>
- Henze, M., Van Loosdrecht, M., Ekama, G. A., & Brdjanovic, D. (2008). *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*. United Kingdom. IWA Pub. <https://doi.org/9781843391883>
- Hernandez-Mendoza, C. E., & Buitrón, G. (2014). Suppression of methanogenic activity in anaerobic granular biomass for hydrogen production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 89(1), 143–149. <https://doi.org/10.1002/jctb.4143>
- Hu, B., & Chen, S. (2007). Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 3266–3273. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.03.005>
- Hu, C., Yan, B., Wang, K. J., & Xiao, X. M. (2018). Modeling the performance of anaerobic digestion reactor by the anaerobic digestion system model (ADSM). *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(2), 2095–2104. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.03.018>
- Hurtado Grueso, M. A., & Muñoz Zambrano, D. M. (2013). *Efecto del Pretratamiento Térmico de un Inoculo en la Producción de Hidrogeno a través de la Fermentación Oscura de Glucosa*. Universidad del Valle.
- Hussain, A., & Dubey, S. K. (2017). Specific methanogenic activity test for anaerobic degradation of influents. *Applied Water Science*, 7(2), 535–542. <https://doi.org/10.1007/s13201-015-0305-z>
- Imam, J., Singh, P. K., & Shukla, P. (2014). Biohydrogen as biofuel: Future prospects and avenues for improvements. In *Biofuel Technologies: Recent Developments* (pp. 301–315). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-34519-7_12
- IRENA - Agencia Internacional de las Energías Renovables. (2018). *Hydrogen from renewable power: Technology outlook for the energy transition*. Retrieved from www.irena.org
- Jijai, S., Srisuwan, G., O-Thong, S., Ismail, N., & Siripatana, C. (2015). Effect of Granule Sizes on the Performance of Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactors for Cassava Wastewater Treatment. In *Energy Procedia* (Vol. 79, pp. 90–97). <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.11.482>
- Joshi, G., Pandey, J. K., Rana, S., & Rawat, D. S. (2017). Challenges and opportunities for the application of biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 850–866. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.185>
- Jurado, C., & Ortiz, N. (2006). *Selección de inóculos para el tratamiento anaerobio de las aguas residuales generadas en el proceso de extracción de almidón de yuca*. Universidad del Valle.
- Kan, E. (2013). Effects of pretreatments of anaerobic sludge and culture conditions on hydrogen productivity in dark anaerobic fermentation. *Renewable Energy*, 49, 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.01.026>
- Kapdan, I. K., & Kargi, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*. <https://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. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.524>
- Khan, M.A., Ngo, H. H., Guo, W. S., Liu, Y., Nghiem, L. D., Hai, F. I., ... Wu, Y. (2016). Optimization of process parameters for production of volatile fatty acid, biohydrogen and methane from anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 219, 738–748. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.073>
- Khan, Mohd Atiqueuzzaman, Ngo, H. H., Guo, W., Liu, Y., Zhang, X., Guo, J., ... Wang, J. (2018). Biohydrogen production from anaerobic digestion and its potential as renewable energy. *Renewable Energy*, 129, 754–768. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.04.029>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2003.11.002>
- Khongklang, P., Kongjan, P., Utarapichat, B., Reungsang, A., & O-Thong, S. (2017). Continuous hydrogen production from cassava starch processing wastewater by two-stage thermophilic dark fermentation and microbial electrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(45), 27584–27592. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.06.145>
- Kim, D. H., Han, S. K., Kim, S. H., & Shin, H. S. (2006). Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(15), 2158–2169. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.02.012>
- Kim, D. H., Kim, S. H., Jung, K. W., Kim, M. S., & Shin, H. S. (2011). Effect of initial pH independent of operational pH on hydrogen fermentation of food waste. *Bioresource Technology*, 102(18), 8646–8652. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.030>
- Kiyasudeen S, K., Ibrahim, M. H., Quaik, S., & Ahmed Ismail, S. (2016). *Prospects of Organic Waste Management and the Significance of Earthworms*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24708-3>
- Kontur, W. S., Noguera, D. R., & Donohue, T. J. (2012). Maximizing reductant flow into microbial H₂ production. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3), 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.003>
- Kothari, R., Singh, D. P., Tyagi, V. V., & Tyagi, S. K. (2012). Fermentative hydrogen production - An alternative clean energy source. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2337–2346. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.002>
- Krzysztof Ziemiński. (2012). Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: Transformations, stages and microorganisms. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 11(18). <https://doi.org/10.5897/AJBX11.054>
- Kumar, G., Bakonyi, P., Kobayashi, T., Xu, K. Q., Sivagurunathan, P., Kim, S. H., ... Bélafi-Bakó, K. (2016). Enhancement of biofuel production via microbial augmentation: The case of dark fermentative hydrogen. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 57, 879–891. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.107>
- Kumar, G., Zhen, G., Kobayashi, T., Sivagurunathan, P., Kim, S. H., & Xu, K. Q. (2016). Impact of pH control and heat pre-treatment of seed inoculum in dark H₂ fermentation: A feasibility report using mixed microalgae biomass as feedstock. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(7), 4382–4392. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.08.069>
- Lay, J. J. (2000). Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(3), 269–278. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000505\)68:3<269::AID-BIT5>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000505)68:3<269::AID-BIT5>3.0.CO;2-T)

- Lazaro, C. Z., Perna, V., Etchebehere, C., & Varesche, M. B. A. (2014). Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(12), 6407–6418. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.02.058>
- Lee, K.-S., Tseng, T.-S., Liu, Y.-W., & Hsiao, Y.-D. (2012). Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 15556–15562. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.039>
- Lens, P., Westermann, P., Haberbauer, M., & Moreno, A. (2005). *Biofuels for fuel cells : renewable energy from biomass fermentation*. IWA Pub.
- Levin, D. B., Pitt, L., & Love, M. (2004). Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(2), 173–185. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00094-6)
- Li, C. L., & Fang, H. H. P. (2007). Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37(1), 1–39. <https://doi.org/10.1080/10643380600729071>
- Lide, D. R. (2005). *CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2005*. Boca Raton, FL. Retrieved from https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/49221189/CRC_Handbook_of_Chemistry_and_Physics_85th_ed_-_David_R._Lide.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1539461528&Signature=x1kHnKqVVifgWKUuvBAMum1xRdQ%253D&response-content-disposition=inline%25
- Lin, C.-Y., Nguyen, T. M.-L., Chu, C.-Y., Leu, H.-J., & Lay, C.-H. (2018). Fermentative biohydrogen production and its byproducts: A mini review of current technology developments. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82(3), 4215–4220. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2017.11.001>
- Lin, C Y, & Lay, C. H. (2005). A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microoora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30, 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.03.002>
- Lin, Chiu Yue, & Chang, R. C. (1999). Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(6), 498–500. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199906\)74:6<498::AID-JCTB67>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199906)74:6<498::AID-JCTB67>3.0.CO;2-D)
- Lin, Chiu Yue, & Cheng, C. H. (2006). Fermentative hydrogen production from xylose using anaerobic mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(7), 832–840. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2005.08.010>
- Lin, Chiu Yue, Lay, C. H., Sen, B., Chu, C. Y., Kumar, G., Chen, C. C., & Chang, J. S. (2012). Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20), 15632–15642. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.072>
- Liu, H., & Fang, H. H. P. (2003). Hydrogen production from wastewater by acidogenic granular sludge. *Water Science and Technology : A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 47(1), 153–158. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12578188>
- Liu, Y., & Wang, Y. (2017). Directional enhancement of fermentative coproduction of hydrogen and acetic acid from glucose via control of headspace pressure. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.09.083>
- Liu, Y., Xu, H.-L., Yang, S.-F., & Tay, J.-H. (2003). Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Research*, 37, 661–673. Retrieved from <https://ac-els-cdn->

com.bd.univalle.edu.co/S0043135402003512/1-s2.0-S0043135402003512-main.pdf?_tid=a88170c2-df72-4ced-b002-d48d205b9959&acdnt=1549409773_ec102957d87838e87945aa83d7c093fb

- Logan, B. E., Oh, S. E., Kim, I. S., & Van Ginkel, S. (2002). Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environmental Science and Technology*, 36(11), 2530–2535. <https://doi.org/10.1021/es015783i>
- Lopez-Hidalgo, A. M., Alvarado-Cuevas, Z. D., & De Leon-Rodriguez, A. (2018). Biohydrogen production from mixtures of agro-industrial wastes: Chemometric analysis, optimization and scaling up. *Energy*, 159, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.06.124>
- Lucas, S., Santos, D., Raphaele, S., Chaves, M., & Van Haandel, A. (2018). Influence of temperature on the performance of anaerobic treatment systems of municipal wastewater. *Water SA*, 44(2), 1816–1850. <https://doi.org/10.4314/wsa.v44i2.07>
- Łukajtis, R., Hołowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyk, P., Przyjazny, A., & Kamiński, M. (2018). Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>
- Luo, G., Xie, L., Zou, Z., Wang, W., & Zhou, Q. (2010). Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. *Bioresource Technology*, 101(3), 959–964. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.090>
- Madeira, J. G. F., Delgado, A. R. S., Boloy, R. A. M., Coutinho, E. R., & Loures, C. C. A. (2017). Exergetic and economic evaluation of incorporation of hydrogen production in a cassava wastewater plant. *Applied Thermal Engineering*, 123, 1072–1078. <https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2017.05.153>
- Mandal, B., Nath, K., & Das, D. (2006). Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnology Letters*, 28(11), 831–835. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9008-8>
- Mannina, G., Ekama, G., Caniani, D., Cosenza, A., Esposito, G., Gori, R., ... Olsson, G. (2016). Science of the Total Environment Greenhouse gases from wastewater treatment — A review of modelling tools. *Science of the Total Environment*, 551–552, 254–270. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.163>
- Mara, D. D. (David D., & Horan, N. J. (2003). *The handbook of water and wastewater microbiology*. Academic.
- Marbán, G., & Valdés-Solís, T. (2007). Towards the hydrogen economy? *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(12), 1625–1637. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.12.017>
- Massanet-Nicolau, J., Dinsdale, R., Guwy, A., & Shipley, G. (2015). Utilising biohydrogen to increase methane production, energy yields and process efficiency via two stage anaerobic digestion of grass. *Bioresource Technology*, 189, 379–383. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.116>
- Megonigal, J. P., Hines, M. E., & Visscher, P. T. (2003). Anaerobic Metabolism: Linkages to Trace Gases and Aerobic Processes. *Treatise on Geochemistry*, 317–424. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043751-6/08132-9>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00130-3)
- Mohammadi, P., Ibrahim, S., Annuar, M. S. M., Ghafari, S., Vikineswary, S., & Zinatizadeh, A. A. (2012, November 1). Influences of Environmental and Operational Factors on Dark Fermentative Hydrogen Production: A Review. *Clean - Soil, Air, Water*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/clen.201100007>

- Mohammadi, P., Ibrahim, S., Mohamad Annuar, M. S., & Law, S. (2011). Effects of different pretreatment methods on anaerobic mixed microflora for hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent. *Journal of Cleaner Production*, 19(14), 1654–1658. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2011.05.009>
- Mu, Y., Yang, H.-Y., Wang, Y.-Z., He, C.-S., Zhao, Q.-B., Wang, Y., & Yu, H.-Q. (2014). The maximum specific hydrogen-producing activity of anaerobic mixed cultures: definition and determination. <https://doi.org/10.1038/srep05239>
- Mu, Y., Yu, H. Q., & Wang, G. (2007). Evaluation of three methods for enriching H₂-producing cultures from anaerobic sludge. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 947–953. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.033>
- Müller, N., Worm, P., Schink, B., Stams, A. J. M., & Plugge, C. M. (2010). Syntrophic butyrate and propionate oxidation processes: from genomes to reaction mechanisms. *Environmental Microbiology Reports*, 2(4), 489–499. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00147.x>
- Nandi, R., & Sengupta, S. (1998). Microbial Production of Hydrogen: An Overview. *Critical Reviews in Microbiology*, 24(1), 61–84. <https://doi.org/10.1080/10408419891294181>
- Nasr, N., Velayutham, P., Elbeshbishy, E., Nakhla, G., El Naggar, M. H., Khafipour, E., ... Hafez, H. (2015). Effect of headspace carbon dioxide sequestration on microbial biohydrogen communities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(32), 9966–9976. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.06.077>
- Nigam, P. S., & Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), 52–68. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2010.01.003>
- Nikolaidis, P., & Poullikkas, A. (2017). A comparative overview of hydrogen production processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 67, 597–611. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.044>
- Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., & Ohba, M. (2002). Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11–12), 1367–1371. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00120-9](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00120-9)
- Ntaikou, I., Antonopoulou, G., & Lyberatos, G. (2010). Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: A review. *Waste and Biomass Valorization*, 1(1), 21–39. <https://doi.org/10.1007/s12649-009-9001-2>
- O-Thong, S. (2017). Microbial Population Optimization for Control and Improvement of Dark Hydrogen Fermentation. In *Fermentation Processes*. InTech. <https://doi.org/10.5772/64208>
- O-Thong, S., Hniman, A., Prasertsan, P., & Imai, T. (2011). Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(5), 3409–3416. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.12.053>
- Oh, S.-E., Zuo, Y., Zhang, H., Guiltinan, M. J., Logan, B. E., & Regan, J. M. (2009). Hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and megaplasmid-deficient mutant M5 evaluated using a large headspace volume technique. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 9347–9353. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.09.084>
- Oh, S. E., Van Ginkel, S., & Logan, B. E. (2003). The Relative Effectiveness of pH Control and Heat Treatment for Enhancing Biohydrogen Gas Production. *Environmental Science and Technology*, 37(22), 5186–5190. <https://doi.org/10.1021/es034291y>
- Oh, S. T., Kang, S. J., & Azizi, A. (2018). Electrochemical communication in anaerobic digestion. *Chemical Engineering Journal*, 353, 878–889. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.07.154>

- Okudoh, V., Trois, C., Workneh, T., & Schmidt, S. (2014). The potential of cassava biomass and applicable technologies for sustainable biogas production in South Africa: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, 1035–1052. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.142>
- Panwar, N. L., Kaushik, S. C., & Kothari, S. (2011). Role of renewable energy sources in environmental protection: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(3), 1513–1524. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.11.037>
- Park, W., Hyun, S. H., Oh, S. E., Logan, B. E., & Kim, I. S. (2005). Removal of headspace CO₂ increases biological hydrogen production. *Environmental Science and Technology*, 39(12), 4416–4420. <https://doi.org/10.1021/es048569d>
- Parra Orobio, B. A., Torres Lozada, P., Marmolejo Rebellón, L. F., Torres López, W. A., Fuentes López, L., Ossa Arias, M. del M., & Barba Ho, L. E. (2016). Evaluación de lodos de PTAR municipales como inóculos en la digestión anaerobia de biorresiduos. *Revista Investigación, Optimización y Nuevos Procesos En Ingeniería*, 29(1), 37–46. <https://doi.org/10.18273/revion.v29n1-2016003>
- Patel, N. K., & Shah, S. N. (2015). Biodiesel from Plant Oils. In *Food, Energy, and Water: The Chemistry Connection* (pp. 277–307). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800211-7.00011-9>
- Paudel, S. R., Banjara, S. P., Choi, O. K., Park, K. Y., Kim, Y. M., & Lee, J. W. (2017). Pretreatment of agricultural biomass for anaerobic digestion: Current state and challenges. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.182>
- Pecorini, I., Baldi, F., & Iannelli, R. (2019). Biochemical Hydrogen Potential Tests Using Different Inocula. *Sustainability*, 11(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/su11030622>
- Pendyala, B., Chaganti, S. R., Lalman, J. A., Shanmugam, S. R., Heath, D. D., & Lau, P. C. K. (2012). Pretreating mixed anaerobic communities from different sources: Correlating the hydrogen yield with hydrogenase activity and microbial diversity. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(17), 12175–12186. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.05.105>
- Penniston, J., & Gueguim Kana, E. B. (2018). Impact of medium pH regulation on biohydrogen production in dark fermentation process using suspended and immobilized microbial cells. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 32(1), 204–212. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1408430>
- Penteado, E. D., Lazaro, C. Z., Sakamoto, I. K., & Zaiat, M. (2013). Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(14), 6137–6145. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.01.067>
- Pérez Vidal, A., Torres Lozada, P., Silva Leal, J., Pérez, A., Torres, P., & Silva, J. (2009). Tratamiento anaerobio de las aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca. Optimización de variables ambientales y operacionales. *Dyna*, 76(160), 139–148. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/496/49612068004.pdf>
- Pirc, E. T., Novosel, B., & Bukovec, P. (2012). Comparison of GC and OxiTop analysis of biogas composition produced by anaerobic digestion of glucose in cyanide inhibited systems. *Acta Chimica Slovenica*, 59(2), 398–404. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24061257>
- Prabakar, D., Manimudi, V. T., Suvetha K, S., Sampath, S., Mahapatra, D. M., Rajendran, K., & Pugazhendhi, A. (2018). Advanced biohydrogen production using pretreated industrial waste: Outlook and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 96, 306–324. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.08.006>
- Premier, G. C., Kim, J. R., Massanet-Nicolau, J., Kyazze, G., Esteves, S. R. R., Penumathsa, B. K. V., ... Guwy, A. J. (2013). Integration of biohydrogen, biomethane and bioelectrochemical systems. *Renewable Energy*,

- 49, 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.01.035>
- Pugazhendhi, A., Kumar, G., & Sivagurunathan, P. (2019). Microbiome involved in anaerobic hydrogen producing granules: A mini review. *Biotechnology Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00301>
- Quintero, M., Castro, L., Ortiz, C., Guzmán, C., & Escalante, H. (2012). Enhancement of starting up anaerobic digestion of lignocellulosic substrate: Figue's bagasse as an example. *Bioresource Technology*, 108, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.052>
- Rafieenia, R., Lavagnolo, M. C., & Pivato, A. (2018). Pre-treatment technologies for dark fermentative hydrogen production: Current advances and future directions. *Waste Management*, 71, 734–748. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.05.024>
- Ramírez-Morales, J. E., Tapia-Venegas, E., Toledo-Alarcón, J., & Ruiz-Filippi, G. (2015). Simultaneous production and separation of biohydrogen in mixed culture systems by continuous dark fermentation. *Water Science and Technology*, 71(9), 1271–1285. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.104>
- Raposo, F., De La Rubia, M. A., Fernández-Cegri, V., & Borja, R. (2011). Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 861–877. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.09.008>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.062>
- Robledo-Narváez, P. N., Muñoz-Páez, K. M., Poggi-Varaldo, H. M., Ríos-Leal, E., Calva-Calva, G., Ortega-Clemente, L. A., ... Salazar-Montoya, J. A. (2013). The influence of total solids content and initial pH on batch biohydrogen production by solid substrate fermentation of agroindustrial wastes. *Journal of Environmental Management*, 128, 126–137. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.04.042>
- Rodionova, M. V., Poudyal, R. S., Tiwari, I., Voloshin, R. A., Zharmukhamedov, S. K., Nam, H. G., ... Allakhverdiev, S. I. (2017). Biofuel production: Challenges and opportunities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(12), 8450–8461. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.125>
- Rojas Chacón, O. (1987). *Relación alcalinidad-ácidos grasos volátiles. Curso Arranque y Operación de Sistemas de Flujo Ascendente con Manto de Lodo UASB*. Cali: Universidad del Valle. Retrieved from <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=107756&indexSearch=ID>
- Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A. D. S., ... Hinton, J. C. D. (2012). Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *Journal of Bacteriology*, 194(3), 686–701. <https://doi.org/10.1128/JB.06112-11>
- Rosa, P. R. F., Gomes, B. C., Varesche, M. B. A., & Silva, E. L. (2016). Characterization and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermentative bioreactors during hydrogen production using cassava processing wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 284, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.08.088>
- Rosa, P. R. F., Santos, S. C., Sakamoto, I. K., Varesche, M. B. A., & Silva, E. L. (2014). The effects of seed sludge and hydraulic retention time on the production of hydrogen from a cassava processing wastewater and glucose mixture in an anaerobic fluidized bed reactor. In *International Journal of Hydrogen Energy* (Vol. 39, pp. 13118–13127). <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.152>
- Rudrum, D. P. (2005). *Innovations in composting pig manure*. Wageningen Universiteit. Retrieved from

<http://edepot.wur.nl/121737>

- Ruggeri, B., Tommasi, T., & Sanfilippo, S. (2015). Pretreatment to Increase Hydrogen Producing Bacteria (HPB) (pp. 25–36). Springer, London. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-6431-9_2
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>
- Salvi, B. L., & Subramanian, K. A. (2015). Sustainable development of road transportation sector using hydrogen energy system. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, 1132–1155. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.030>
- Sawatdeenarunat, C., Nguyen, D., Surendra, K. C., Shrestha, S., Rajendran, K., Oechsner, H., ... Khanal, S. K. (2016). Anaerobic biorefinery: Current status, challenges, and opportunities. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.074>
- Scaglione, D., Caffaz, S., Ficara, E., Malpei, F., & Lubello, C. (2008). A simple method to evaluate the short-term biogas yield in anaerobic codigestion of was and organic wastes. *Water Science and Technology*, 58(8), 1615–1622. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.502>
- Schievano, A., Tenca, A., Lonati, S., Manzini, E., & Adani, F. (2014). Can two-stage instead of one-stage anaerobic digestion really increase energy recovery from biomass? *Applied Energy*, 124, 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.03.024>
- Schwartz, E., Fritsch, J., & Friedrich, B. (2013). H₂-Metabolizing Prokaryotes. In *The Prokaryotes* (pp. 119–199). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_65
- Seghezzo, L., Zeeman, G., Van Lier, J. B., Hamelers, H. V. M., & Lettinga, G. (1998). A REVIEW: THE ANAEROBIC TREATMENT OF SEWAGE IN UASB AND EGSB REACTORS. *Bioresource Technology*, 65, 175–190. Retrieved from https://ac-els-cdn-com.bd.univalle.edu.co/S0960852498000467/1-s2.0-S0960852498000467-main.pdf?_tid=39112764-ab9e-479f-b4b3-76dd4b490e53&acdnat=1549405732_2d255532ae95a2c3ff8c2744c5bacd22
- Sen, B., Aravind, J., Kanmani, P., & Lay, C. H. (2016). State of the art and future concept of food waste fermentation to bioenergy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 53, 547–557. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.08.065>
- Şenol, M., Abbasoğlu, S., Kükrer, O., & Babatunde, A. A. (2016). A guide in installing large-scale PV power plant for self consumption mechanism. *Solar Energy*, 132, 518–537. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2016.03.035>
- Serban, M., Lewis, M. A., Marshall, C. L., & Doctor, R. D. (2003). Hydrogen production by direct contact pyrolysis of natural gas. *Energy and Fuels*, 17(3), 705–713. <https://doi.org/10.1021/ef020271q>
- Setlow, P. (2003). Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 550–556. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.10.001>
- Shahsavari, A., & Akbari, M. (2018). Potential of solar energy in developing countries for reducing energy-related emissions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.065>
- Sharma, A., & Arya, S. K. (2017). Hydrogen from algal biomass: A review of production process. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*, 15, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.06.001>
- Shin, H. S., Youn, J. H., & Kim, S. H. (2004). Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(13), 1355–1363.

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2003.09.011>

- Show, K. Y., Lee, D. J., Tay, J. H., Lin, C. Y., & Chang, J. S. (2012). Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.109>
- Siddique, M. N. I., & Wahid, Z. A. (2018). Achievements and perspectives of anaerobic co-digestion: A review. *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.155>
- Singh, L., & Wahid, Z. A. (2015). Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.05.035>
- Singh, S., Jain, S., Ps, V., Tiwari, A. K., Nouni, M. R., Pandey, J. K., & Goel, S. (2015). Hydrogen: A sustainable fuel for future of the transport sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, 623–633. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.040>
- Sinha, P., & Pandey, A. (2011). An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13), 7460–7478. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.077>
- Sinha, P., Roy, S., & Das, D. (2015). Role of formate hydrogen lyase complex in hydrogen production in facultative anaerobes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(29), 8806–8815. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.05.076>
- Sivagurunathan, P., Kumar, G., Bakonyi, P., Kim, S. H., Kobayashi, T., Xu, K. Q., ... Bélafi-Bakó, K. (2016). A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(6), 3820–3836. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.12.081>
- Smith, J. M. (Joseph M., Van Ness, H. C. (Hendrick C. ., & Abbott, M. M. (2000). *Introduction to chemical engineering thermodynamics*. Boston: McGraw-Hill. Retrieved from <http://www.worldcat.org/title/introduction-to-chemical-engineering-thermodynamics/oclc/56491111>
- Solera del Río, R. (2014). *Aspectos biológicos de la digestión anaeróbica*. Mundi-Prensa.
- Solowski, G., Shalaby, M. S., Abdallah, H., Shaban, A. M., & Cenian, A. (2018). Production of hydrogen from biomass and its separation using membrane technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 3152–3167. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.10.027>
- Song, Z. X., Dai, Y., Fan, Q. L., Li, X. H., Fan, Y. T., & Hou, H. W. (2012). Effects of pretreatment method of natural bacteria source on microbial community and bio-hydrogen production by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(7), 5631–5636. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.010>
- Sperling, M. von., & Chernicharo, C. A. de L. (2005). *Biological wastewater treatment in warm climate regions*. IWA.
- Stazi, V., & Tomei, M. C. (2018). Enhancing anaerobic treatment of domestic wastewater: State of the art, innovative technologies and future perspectives. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.071>
- Surendra, K. C., Takara, D., Hashimoto, A. G., & Khanal, S. K. (2014). Biogas as a sustainable energy source for developing countries: Opportunities and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31, 846–859. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.12.015>
- Tabatabaei, M., Rahim, R. A., Abdullah, N., Wright, A. D. G., Shirai, Y., Sakai, K., ... Hassan, M. A. (2010). Importance of the methanogenic archaea populations in anaerobic wastewater treatments. *Process*

- Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.05.017>
- Tanisho, S. (2002). Effect of CO₂ removal on hydrogen production by fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 23(7), 559–563. [https://doi.org/10.1016/s0360-3199\(97\)00117-1](https://doi.org/10.1016/s0360-3199(97)00117-1)
- Tapia-Venegas, E., Ramirez-Morales, J. E., Silva-Illanes, F., Toledo-Alarcón, J., Paillet, F., Escudie, R., ... Ruiz-Filippi, G. (2015). Biohydrogen production by dark fermentation: scaling-up and technologies integration for a sustainable system. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 14(4), 761–785. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9383-5>
- Tonello, T. U., Andreani, C. L., Mari, A. G., Fernandes, J. R., & Gomes, S. D. (2018). BIOHYDROGEN PRODUCTION IN AnSBBR IN FED-BATCH FROM STARCH EFFLUENT: INFLUENCE OF ORGANIC LOAD. *Engenharia Agrícola*, 38(5), 768–775. <https://doi.org/10.1590/1809-4430-eng.agric.v38n5p768-775/2018>
- Torres, D. G. B., Lucas, S. D. M., Andreani, C. L., Carvalho, K. Q. de, Coelho, S. R. M., & Gomes, S. D. (2017). HYDROGEN PRODUCTION AND PERFORMANCE OF ANAEROBIC FIXED-BED REACTORS USING THREE SUPPORT ARRANGEMENTS FROM CASSAVA STARCH WASTEWATER. *Engenharia Agrícola*, 37(1), 160–172. <https://doi.org/10.1590/1809-4430-eng.agric.v37n1p160-172/2017>
- Torres Lozada, P., Marmolejo Rebellón, L. F., Cajigas Cerón, Á. A., & Cerón, Á. A. C. (2014). Cassava starch separation: evaluation of sedimentation by gravity in channels. *Ingeniería e Investigación*, 34(1), 42–47. <https://doi.org/10.15446/ing.investig.v34n1.40049>
- Torres, P., & Pérez, A. (2010). Actividad Metanogénica específica: una herramienta de control y optimización de sistemas de tratamiento anaerobio de aguas residuales. *Ingeniería de Recursos Naturales y Del Ambiente*, 9, 5–14. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/2311/231116434001.pdf>
- Torres, P., Pérez, A., Cajigas, Á. A., Jurado, C., & Ortiz, N. (2007). Selección de inóculos para el tratamiento anaerobio de aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca. *Ingeniería de Recursos Naturales y Del Ambiente*, (6), 105–111. Retrieved from <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/xmlui/handle/10893/2597>
- Torres, P., Pérez, A., Marmolejo, L. F., Ordóñez, J. A., & García, R. E. (2010). UNA MIRADA A LA AGROINDUSTRIA DE EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA, DESDE LA ESTANDARIZACIÓN DE PROCESOS (VIEW OF AGROINDUSTRY OF CASSAVA STARCH EXTRACTION FROM THE PROCESS STANDARDIZATION). *Revista EIA*, 7(14), 23–38. <https://doi.org/10.24050/REIA.V7I14.416>
- Trevisan, V. (2010). *Proposta de metodologia para determinação da atividade hidrogênica específica*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Retrieved from <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/33786>
- Trevisan, V., Monteggia, L. O., & Dos Santos Delabary, H. (2015). Methodology to determine the specific hydrogenic activity (SHA) of waste sludges. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(32), 9977–9981. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.06.079>
- Uçkun Kiran, E., Stamatelatos, K., Antonopoulou, G., & Lyberatos, G. (2016). Production of biogas via anaerobic digestion. In *Handbook of Biofuels Production: Processes and Technologies: Second Edition* (pp. 259–301). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100455-5.00010-2>
- Valdez-Vazquez, I., & Poggi-Varaldo, H. M. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2008.03.003>
- Valdez-Vazquez, I., Ríos-Leal, E., Esparza-García, F., Cecchi, F., & Poggi-Varaldo, H. M. (2005). Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(13–14), 1383–1391.

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.09.016>

- Van Ginkel, S., Sung, S., & Lay, J. J. (2001). Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science and Technology*, 35(24), 4726–4730. <https://doi.org/10.1021/es001979r>
- Vardar-Schara, G., Maeda, T., & Wood, T. K. (2008). Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. *Microbial Biotechnology*, 1(2), 107–125. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2007.00009.x>
- Vávrová, K., Knápek, J., & Weger, J. (2017). Short-term boosting of biomass energy sources – Determination of biomass potential for prevention of regional crisis situations. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 67, 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.015>
- Venkata Mohan, S., Lalit Babu, V., & Sarma, P. N. (2007). Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor (AnSBR): Effect of organic loading rate. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(4), 506–515. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.04.007>
- Venkata Mohan, S., Lalit Babu, V., & Sarma, P. N. (2008). Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresource Technology*, 99(1), 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.004>
- Vidadili, N., Suleymanov, E., Bulut, C., & Mahmudlu, C. (2017). Transition to renewable energy and sustainable energy development in Azerbaijan. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.168>
- Voolapalli, R. K., & Stuckey, D. C. (2001). Hydrogen production in anaerobic reactors during shock loads - Influence of formate production and H₂ kinetics. *Water Research*, 35(7), 1831–1841. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00441-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00441-3)
- Wang, C. C., Chang, C. ., Chu, C. P., Lee, D. J., Chang, B.-V., & Liao, C. S. (2003). Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. *Journal of Biotechnology*, 102(1), 83–92. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(03\)00007-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(03)00007-5)
- Wang, J., & Wan, W. (2008a). Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.03.048>
- Wang, J., & Wan, W. (2008b). Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(20), 5392–5397. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.010>
- Wang, J., & Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.015>
- Wang, J., & Yin, Y. (2017). Principle and application of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(8), 4804–4823. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.135>
- Wang, J., & Yin, Y. (2018). Fermentative hydrogen production using various biomass-based materials as feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.033>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.09.092>
- Westermann, P., Jørgensen, B., Lange, L., Ahring, B. K., & Christensen, C. H. (2007). Maximizing renewable

- hydrogen production from biomass in a bio/catalytic refinery. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(17), 4135–4141. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.06.018>
- Wilkinson, K. G. (2011). A comparison of the drivers influencing adoption of on-farm anaerobic digestion in Germany and Australia. *Biomass and Bioenergy*. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.013>
- Wojcieszak, M., Pyzik, A., Poszytek, K., Krawczyk, P. S., Sobczak, A., Lipinski, L., ... Drewniak, L. (2017). Adaptation of methanogenic inocula to anaerobic digestion of maize silage. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01881>
- Wong, Y. M., Wu, T. Y., & Juan, J. C. (2014). A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, 471–482. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.008>
- Wu, X., Yang, H., & Guo, L. (2009). Effect of operation parameters on anaerobic fermentation using cow dung as a source of microorganisms. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.039>
- Xiao, B., Han, Y., & Liu, J. (2010). Evaluation of biohydrogen production from glucose and protein at neutral initial pH. *Renewable Energy*, 35(12), 6152–6160. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.084>
- Yasin, N. H. M., Mumtaz, T., Hassan, M. A., & Abd Rahman, N. (2013). Food waste and food processing waste for biohydrogen production: A review. *Journal of Environmental Management*. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.09.009>
- Yela Larrahondo, J. Y., & Peña Castañeda, L. C. (2015). *INFLUENCIA DE LA RELACIÓN SUSTRATO: LODO EN LA PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO A PARTIR DE AGUA RESIDUAL AGROINDUSTRIAL*. Universidad del valle.
- Yin, Y., Hu, J., & Wang, J. (2014). Enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge by different pretreatment methods. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, 13550–13556. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.01.145>
- Yuan, H., & Zhu, N. (2016). Progress in inhibition mechanisms and process control of intermediates and by-products in sewage sludge anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.261>
- Yun, Y.-M., Lee, M.-K., Im, S.-W., Marone, A., Trably, E., Shin, S.-R., ... Kim, D.-H. (2018). Biohydrogen production from food waste: Current status, limitations, and future perspectives. *Bioresource Technology*, 248, 79–87. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.06.107>
- Zahedi, S., Solera, R., Micolucci, F., Cavinato, C., & Bolzonella, D. (2016). Changes in microbial community during hydrogen and methane production in two-stage thermophilic anaerobic co-digestion process from biowaste. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.01.016>
- Zajic, J. E., Kosaric, N., & Brosseau, J. D. (1978). Microbial production of hydrogen. In *Advances in Biochemical Engineering, Volume 9* (pp. 57–109). Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/BFb0048091>
- Zhang, F., Zhao, P., Niu, M., & Maddy, J. (2016). The survey of key technologies in hydrogen energy storage. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(33), 14535–14552. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.05.293>
- Zhang, K., Ren, N., Guo, C., Wang, A., & Cao, G. (2011). Effects of various pretreatment methods on mixed microflora to enhance biohydrogen production from corn stover hydrolysate. *Journal of Environmental*

- Sciences*, 23(12), 1929–1936. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60679-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60679-1)
- Zhang, M., Xie, L., Yin, Z., Khanal, S. K., & Zhou, Q. (2016). Biorefinery approach for cassava-based industrial wastes: Current status and opportunities. *Bioresource Technology*, 215, 50–62. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.026>
- Zhong, W., An, H., Shen, L., Dai, T., Fang, W., Gao, X., & Dong, D. (2017). Global pattern of the international fossil fuel trade: The evolution of communities. *Energy*, 123, 260–270. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.02.033>
- Zhou, M., Zhou, J., Tan, M., Du, J., Yan, B., Wong, J. W. C., & Zhang, Y. (2017). Enhanced carboxylic acids production by decreasing hydrogen partial pressure during acidogenic fermentation of glucose. *Bioresource Technology*, 245, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.152>
- Zhu, H., & Béland, M. (2006). Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(14), 1980–1988. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.01.019>
- Zinatizadeh, A. A., Mirghorayshi, M., Birgani, P. M., Mohammadi, P., & Ibrahim, S. (2017). Influence of thermal and chemical pretreatment on structural stability of granular sludge for high-rate hydrogen production in an UASB bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(32), 20512–20519. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.07.029>