



TATIANA MAÑUNGA

*ACOPLE ENTRE UN REACTOR ANAEROBIO DE MEDIO
SUSPENDIDO Y UN REACTOR ANAEROBIO DE
CRECIMIENTO ADHERIDO PARA LA PRODUCCIÓN DE
HIDRÓGENO Y METANO A PARTIR DE AGUA RESIDUAL
DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA*

Tesis presentada al Programa Doctorado en Ingeniería énfasis en Ingeniería Sanitaria y Ambiental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad del Valle, como parte de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ingeniería

Directores:

Prof. Jenny Alexandra Rodríguez Victoria

Escuela de Ingeniería de los Recursos Naturales y del Ambiente, Universidad del Valle

Prof. Marcelo Zaiat

Departamento de Ingeniería Hidráulica y Saneamiento (São Carlos), Universidad de São Paulo

2019

Santiago de Cali, Colombia

*Dedicado a mi familia
mamá, hermanas y sobrinos*

A mi pequeño bebe, solo faltabas tú en mi vida

*“Ama y haz lo que quieras, sí el amor está en tú corazón nada más sino el bien
brotará de él”*

San Agustín

Agradecimientos

Primero agradezco a Dios que es vida y me ha dado la oportunidad de transitar este camino.

A mi familia por el apoyo constante, especialmente a mi mamá Delfa y a mis hermanas Ana y Cata, a mi sobrino Juan David por su constante preocupación por mi tesis.

También deseo agradecer a mi tutora Prof. Jenny Alexandra Rodríguez V. por la confianza depositada y constante orientación para la realización de esta investigación, pero sobre todo por sus palabras sinceras en los momentos precisos, por las enseñanzas de vida a través de sus consejos, por obligarme a hablar cuando quería callar y por escuchar todos mis silencios y lágrimas.

Adicionalmente, tengo un profundo agradecimiento hacia mi tutor el Prof. Marcelo Zaiat por su orientación precisa, por las palabras de aliento y su constante e inagotable disposición. Por darme la oportunidad de realizar una pasantía en el Laboratorio de Procesos Biológicos - EESC – São Paulo.

Gracias a mis estudiantes, colegas y amigos del Laboratorio de Biotecnología Ambiental (Univalle), Julián David Barrios, Marcela Campo, Jenifer Yela, Catalina Peña, Víctor Castaño, Diana Delgado, Natalia Álvarez y Liz Arias, sin ustedes no habría sido posible. A las señoras de la “yuca” Fabiola y Orfa sin ustedes tampoco hubiese sido posible.

Gracias al Laboratorio de Saneamiento Ambiental de la Universidad Militar Nueva Granada, especialmente a la Prof. Tatiana Rodríguez Chaparro por su increíble amabilidad y por darnos acceso a su laboratorio. También a sus chicas, Margarita y Andrea por el curso rápido de cromatografía de gases.

Gracias a todo el personal del Laboratorio de Procesos Biológicos y a los profesionales maravillosos que ahí conocí, que hicieron de mi estancia un periodo feliz. Gracias a Eduardo Penteado y Prof. Simone Damasceno Gomes por toda la paciencia y por todo lo enseñado, especialmente por su sincero interés y valiosa ayuda en todo momento. Gracias desde el corazón a Carolina Zampol, porque me acogió en su hogar y me enseñó a ayudar solo por el placer de hacerlo, gracias Caro por tu increíble amistad.

Al Laboratorio de Microbiología Industrial y Ambiental (Univalle) particularmente a Luis Enrique Mora Arismendi y a sus dos chicas maravillosas: Eliana y Esperanza, que siempre con su sonrisa y amabilidad estuvieron dispuestas a enseñarme y ayudarme para la realización de análisis microbiológicos.

A la Prof. Patricia Torres por su interés sincero durante la realización de esta investigación. A la coordinación de PISA por su disposición hacia los estudiantes, a Miriam Mosquera su secretaria por la ayuda en los procesos administrativos.

A mis amigos de siempre Tere y Nancy por las risas en los momentos difíciles. A los nuevos amigos: Eleana “L”, Eliana, Dayana, Jhonatan y Paula, gracias chicos por hacer de este, un periodo feliz.

A ti ENLO, por regalarme tu amistad sincera, tus palabras de aliento y apoyo incondicional en la etapa final.

Y por último, pero no menos importante a la Universidad del Valle por la financiación del proyecto de investigación y otros recursos, y a Colciencias por la beca doctoral concedida.

Resumen

MAÑUNGA.T. Acople entre un reactor anaerobio de medio suspendido y un reactor anaerobio de crecimiento adherido para la producción de hidrógeno y metano a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. Tesis (Doctorado) - Universidad del Valle, 2019

Con relación a la producción de hidrógeno, se evaluó el efecto de cuatro variables sobre el rendimiento de hidrógeno (HY), las variables fueron *pH inicial*, *pretratamiento del inóculo*, *relación S/X* y *Carga Orgánica Volumétrica Específica (COVe)*. Adicionalmente, en este estudio se investigó el uso del efluente de un reactor acidogénico (RA) para la producción de metano con énfasis en el arranque de un reactor metanogénico. Inicialmente, en condiciones de flujo discontinuo fue verificado el efecto del pretratamiento del inóculo y pH inicial sobre el HY. Se evaluaron dos métodos para el pretratamiento del inóculo (térmico -Tco) y químico-Qco), y el pH inicial fue evaluado en tres niveles (5,7, 5,4, y 5,0). Los resultados indicaron que los pretratamientos inhibieron la actividad de bacterias consumidoras de hidrógeno (BCH) durante periodos relativamente cortos (< 100 h). Los mayores HY fueron observados en la combinación Tco5,0 ($1,25 \pm 0,01 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ CH}$) seguido de la combinación Qco5,4 ($1,10 \pm 0,02 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ CH}$). La evaluación del efecto del pH inicial sobre el HY mostró que un pH de fermentación entre 5,0 y 5,4 es adecuado para mejorar el HY. Luego, en condiciones de flujo discontinuo se verificó la influencia de la relación S/X sobre el HY a partir de agua residual sintética (S1) y agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca (S2). Se seleccionaron tres niveles de la relación S/X (2, 4 y 6 g DQO.g⁻¹ SV). Los resultados indicaron que el HY disminuyó al incrementar la relación S/X con el sustrato S2, en comparación con el control (S1). Para el sustrato S2 el máximo HY de $1,98 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ CH}_r$ fue encontrado con la relación S/X 2.0 g DQO.g⁻¹ SV con una tasa de producción específica de hidrógeno de $6,60 \text{ mL H}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ SV} \cdot \text{h}^{-1}$. Después, empleando reactores acidogénicos (RA) de crecimiento suspendido fue evaluada la influencia de la COVe sobre el HY. Para tal fin, tres RA fueron inoculados con lodo anaerobio mixto pretratado térmicamente (85°C, 30 min), alimentados con agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca y operados en flujo continuo a temperatura ambiente, con tres diferentes COVe (0,8, 1,5 y 3,1 g CH. g⁻¹ SV.d⁻¹) y TRH de 10 h. Aunque esta hipótesis no pudo ser demostrada debido a las posibles interferencias del sustrato sobre las rutas metabólicas, los resultados mostraron una mejor estabilidad del RA operado con una COVe de 0,8 g CH.g⁻¹ SV.d⁻¹, no solo porque permitió un mejor control y cuantificación de la biomasa sino porque fomentó la formación consistente de gránulos productores de hidrógeno (GPH) lo cual resultó de interés para el uso de RA de crecimiento suspendido en la producción biológica de H₂ ya que permite el desacople entre el tiempo de retención celular y el TRH. Finalmente, a través del acople entre un RA y un reactor metanogénico (RM) de crecimiento adherido y flujo mixto se investigó el uso del efluente del RA para la producción de metano, simulando un proceso de digestión anaerobia en dos fases, con énfasis en el periodo de arranque del RM. Los resultados mostraron que operar el RA con un TRH de 8 h, COVe de 0,8 g CH.g⁻¹ SV.d⁻¹ y pH de $5,2 \pm 0,2$ permitió la formación de GPH, lo cual representa un conjunto de condiciones operacionales iniciales para continuar desarrollando la producción biológica de hidrógeno en reactores de crecimiento auto-inmovilizado con control sobre el crecimiento de la biomasa. Sin embargo, se deben adicionar otras estrategias de operación para lograr un HY estable a partir del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. Por otro lado, se encontró que es factible la producción de metano a partir del efluente acidogénico. Además que un TRH de 28 h y COV de $4,8 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ es una condición de operación inicial adecuada para acoplar el RM con el RA. También que el RM soporta cargas orgánicas hasta del orden de $100 \text{ g DQO} \cdot \text{d}^{-1}$ siempre que la concentración de DQO y AGV no sea superior a $8.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y $2.000 \text{ mg A} \cdot \text{Acético} \cdot \text{L}^{-1}$.

Palabras claves: producción fermentativa de hidrógeno, carga orgánica volumétrica específica, digestión anaerobia en dos fases, agua residual agroindustrial, reactor anaerobio

Abstract

MAÑUNGA.T. **Coupling between a suspended growth anaerobic reactor and an anaerobic baffled reactor to hydrogen and methane production from cassava wastewater.** Thesis (Doctorate) - Universidad del Valle, 2019

Regarding the production of hydrogen, in this study was evaluated the effect of four variables on the hydrogen yield (HY). The variables were *initial pH*, *pre-treatment of inoculum*, *S/X ratio* and *specific organic load (SOL)*. Furthermore, in this study was to investigate the use of the effluent from an acidogenic reactor for methane production with an emphasis on the start-up of a methanogenic reactor. First, in batch conditions was evaluated the combined effect of mixed inoculum pre-treatment and initial pH on HY hydrogen production. Two pre-treatment methods were evaluated (chemical and thermal pre-treatment), and the initial pH was examined at three levels (5.7, 5.4, and 5.0). The results indicated that pre-treatments efficiently inhibited the activity of hydrogen-consuming bacteria (methanogenic archaea) for relatively short periods. The highest biogas production, 91 mL, was achieved with chemical pre-treatment at pH 5.4, and 86 mL of biogas was obtained with thermal pre-treatment at pH 5.0. Moreover, the results indicated that the optimum pH interval for fermentative hydrogen production from cassava wastewater was between 5.0 and 5.4, and the highest HY was $1.25 \pm 0.01 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ carbohydrates}$ with the combined conditions of thermal pre-treatment and pH 5.0. Second, also in batch reactors, the effect of the substrate/biomass ratio (S/X) on the hydrogen yield was evaluated in synthetic wastewater (S1) and cassava starch wastewater (S2). S/X ratios of 2, 4 and 6 g chemical oxygen demand (COD).g⁻¹ volatile solids (VS) were studied through biochemical hydrogen potential tests. The experimental results showed that with an increasing S/X ratio, the hydrogen yield from S2 also decreased in comparison with the control experiments (S1). For S2, S/X = 2 improved the hydrogen yield, producing a maximum yield of $1.98 \text{ mol H}_2.\text{mol}^{-1} \text{ carbohydrates}$ with a specific hydrogen production rate of $6.60 \text{ mL H}_2.\text{g}^{-1} \text{ VS.h}^{-1}$. Third, the effect of SOL on HY was evaluated using suspended growth acidogenic reactors (AR). Three AR were inoculated with mixed anaerobic pre-treated during 30 min at 85°C and they were continuously feeding with cassava wastewater and operated to three different SOL (0.8, 1.5 y 3.1 g carbohydrates. g⁻¹ VS.d⁻¹) and 10 h of HRT. Although the hypothesis could not be demonstrated due to the possible interferences of the substrate on the metabolic routes, the AR operated with a SOL of 0.8 g carbohydrates. g⁻¹ VS.d⁻¹ showed best stability due to it allowed best control and quantification of the biomass. Also, it promoted the hydrogen-producing granules (HPG) formation which was of interest for applied of suspended reactors in the biological hydrogen production since it allows the decoupling between the retention time cellular and HRT. And finally, the use of the AR effluent to methane production was investigated, through the coupling between an RA and a fixed-bed reactor (MR) simulating a two phases anaerobic digestion process, with emphasis on the start-up period of the MR. The results showed that 8 h of HRT, SOL of 0.8 g carbohydrates. g⁻¹ VS.d⁻¹ and pH of 5.2 ± 0.2 allowed the formation of HPG in the AR. Thus, these operational conditions represent a starting point to continue developing the biological production of hydrogen in self-immobilized growth reactors with control over the growth of biomass. However, other operation strategies must be added to achieve a stable HY from the cassava wastewater. On the other hand, it was found that the production of methane from the acidogenic effluent is feasible. In addition, an HRT of 28 h and organic load rate of $4.8 \text{ g COD.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ is an appropriate initial operating condition for coupling the MR with the AR. Also, the MR supports organic loads until 100 g COD.d^{-1} provided that COD and volatile fatty acids are not higher than 8000 mg.L^{-1} and $2000 \text{ mg A. Acetic.L}^{-1}$, respectively.

Keywords: Biological hydrogen production, specific organic load, cassava wastewater, fixed-bed anaerobic reactor, two-phase anaerobic digestion

Contenido

<i>Capítulo 1</i>	Revisión de literatura.....	7
1.1	FUNDAMENTOS DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA	7
1.2	REQUERIMIENTOS AMBIENTALES, VARIABLES DE CONTROL Y OPERACIÓN. 9	
1.2.1	pH, ALCALINIDAD Y CAPACIDAD “BUFFER”	9
1.2.2	NUTRIENTES	12
1.2.3	TEMPERATURA	12
1.2.4	TIEMPO DE RETENCIÓN HIDRÁULICO (TRH).....	12
1.2.5	CARGA ORGÁNICA VOLUMÉTRICA (COV).....	13
1.3	REACTOR ANAEROBIO DE CRECIMIENTO ADHERIDO	13
1.3.1	MEDIO DE SOPORTE O ADHERENCIA	13
1.4	FACTORES RELACIONADOS CON EL ARRANQUE DE REACTORES ANAEROBIOS	14
1.4.1	INOCULACIÓN	15
1.4.2	AUMENTO DE CARGA ORGÁNICA VOLUMÉTRICA (COV).....	16
1.4.3	RENDIMIENTO DE METANO (MY).....	17
1.5	DIGESTIÓN ANAEROBIA EN DOS FASES	17
1.5.1	REACTOR ACIDOGÉNICO (RA)	19
1.5.2	REACTOR METANOGÉNICO (RM)	20
1.6	PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO A TRAVES DE LA FERMENTACIÓN OSCURA 22	
1.6.1	TIPO Y PRETRATAMIENTO DEL INÓCULO	22
1.6.2	pH y AGV	23
1.6.3	RELACIÓN SUSTRATO/BIOMASA (Relación S/X).....	25
1.6.4	CARGA ORGÁNICA VOLUMÉTRICA ESPECÍFICA (COVe).....	27
1.7	REACTORES ANAEROBIOS DE BIOMASA SUSPENDIDA	27
1.8	ACOPLE DE REACTORES ANAEROBIOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO Y BIOMETANO	29
1.9	PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA, AGUA RESIDUAL Y TRATAMIENTO ANAEROBIO.....	33
1.9.1	AGUA RESIDUAL DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA ...	34
1.9.2	TRATAMIENTO ANAEROBIO DEL AGUA RESIDUAL DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA	35
1.10	PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO Y METANO A PARTIR DE AGUA RESIDUAL DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA	37

1.11	CONSIDERACIONES FINALES	41
1.12	REFERENCIAS DEL CAPÍTULO 1.....	43
<i>Capítulo 2 Objetivos de la investigación.....</i>		<i>58</i>
2.1	OBJETIVO GENERAL	58
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
<i>Capítulo 3 Influencia del pretratamiento del inóculo, pH inicial y relación sustrato/biomasa sobre la producción fermentativa de hidrógeno</i>		<i>59</i>
3.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
3.1.1	SUSTRATO	60
3.1.2	INÓCULO Y ACLIMATACIÓN	61
3.1.3	UNIDAD EXPERIMENTAL.....	62
3.1.4	SEGUIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE BIOGAS	63
3.1.5	EXTRACCIÓN DEL BIOGAS.....	63
3.1.6	DESCRIPCIÓN DEL ARREGLO EXPERIMENTAL – E1	64
3.1.6.1	Pretratamiento del inóculo.....	64
3.1.6.2	Selección del pH inicial.....	65
3.1.7	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL – E1	65
3.1.8	SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN – E1	66
3.1.9	DESCRIPCIÓN DEL ARREGLO EXPERIMENTAL – E2	66
3.1.9.1	Relación S/X.....	66
3.1.9.2	Pretratamiento del inóculo y pH inicial.....	66
3.1.10	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL – E2	67
3.1.11	SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN – E2	67
3.1.12	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	68
3.1.12.1	Composición del biogás	68
3.1.12.2	Análisis fisicoquímico del sobrenadante	69
3.1.12.3	Cálculos	69
3.1.12.4	Análisis cinético	69
3.1.12.5	Análisis estadístico	70
3.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	72
3.2.1	EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO DEL INÓCULO Y pH INICIAL	72
3.2.1.1	Producción acumulada de biogás	72
3.2.1.2	Reducción de carbohidratos y reducción de AGV	75
3.2.1.3	Rendimiento de hidrógeno (HY).....	75
3.2.2	EFFECTO DE LA RELACIÓN S/X.....	77
3.2.2.1	Consumo del sustrato, producción de AGV y pH final.....	77

3.2.2.2	Producción de AGV y pH final	79
3.2.2.3	Producción acumulativa de biogás (Pg), Rendimiento de biogás e hidrógeno y tasa de rendimiento específico	81
3.3	CONCLUSIONES PARCIALES DEL CAPÍTULO 3	86
3.4	RECOMENDACIONES	87
3.5	REFERENCIAS CAPÍTULO 3	87
<i>Capítulo 4 Influencia de la orgánica volumétrica (COVe) sobre la producción fermentativa de hidrógeno</i>		
93		
4.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	94
4.1.1	SUSTRATO	94
4.1.2	INÓCULO Y ACLIMATACIÓN	94
4.1.2.1	Aclimatación	94
4.1.2.2	Pretratamiento del inóculo aclimatado	96
4.1.3	UNIDAD EXPERIMENTAL.....	97
4.1.4	SEGUIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS	98
4.1.4.1	Extracción del biogás	99
4.1.5	DESCRIPCIÓN DEL ARREGLO EXPERIMENTAL.....	99
4.1.5.1	Carga Orgánica Volumétrica Específica (COVe)	99
4.1.5.2	Definición de condiciones de operación del RA	100
4.1.6	INOCULACIÓN Y ARRANQUE DEL REACTOR ACIDOGÉNICO	100
4.1.7	OPERACIÓN, SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN	101
4.1.7.1	Operación en flujo continuo	102
4.1.7.2	Seguimiento y evaluación del desempeño del RA	102
4.1.7.3	Control de la COVe.....	102
4.1.8	DISTRIBUCIÓN DE BIOMASA Y pH DENTRO DEL RA.....	103
4.1.9	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	103
4.1.9.1	Composición del biogás	103
4.1.9.2	Análisis fisicoquímico de la fase líquida y zona de lodos	103
4.1.10	CÁLCULOS.....	103
4.1.10.1	Carga orgánica volumétrica o carga orgánica aplicada (COV)	103
4.1.10.2	Tiempo de retención hidráulico (TRH)	104
4.1.10.3	Reducción del sustrato (η).....	104
4.1.10.4	Caudal de biogás ($Q_{\text{biogás}}$)	104
4.1.10.5	Tasa de producción volumétrica de biogás (PVB)	104
4.1.10.6	Composición del biogás	105
4.1.10.7	Caudal molar de hidrógeno ($Q_{M_{H_2}}$)	105

4.1.10.8	Rendimiento de hidrógeno (HY) y rendimiento de biogás (BY)	105
4.1.10.9	Producción de AGV (%P)	106
4.1.11	MANEJO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	106
4.1.11.1	Análisis comparativo de la composición fisicoquímica del afluente en cada COVe	106
4.1.11.2	Diseño experimental estadístico	107
4.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	107
4.2.1	ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES.....	107
4.2.1.1	Composición fisicoquímica del afluente	107
4.2.1.2	Nutrientes	109
4.2.1.3	Temperatura ambiente.....	109
4.2.2	EFFECTO DE LA VARIACIÓN DE LA COVe	110
4.2.2.1	Composición y rendimiento de biogás	110
4.2.2.2	Rendimiento de hidrógeno (HY) y reducción de carbohidratos.....	111
4.2.2.3	Tasa de producción volumétrica de biogás (PVB) e hidrógeno (PVH).....	113
4.2.2.4	Tasa de producción específica de hidrógeno (TPe).....	114
4.2.3	EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS FISICOQUIMICOS EN LA FASE LÍQUIDA.....	116
4.2.3.1	pH y Alcalinidad bicarbonática (AB).....	116
4.2.3.2	DQO y Ácidos grasos volátiles (AGV)	118
4.2.3.3	Sólidos totales (ST) y volátiles (SV).....	120
4.2.3.4	Biomasa y distribución de SV dentro del RA.....	122
4.2.3.5	Nutrientes y el efecto de la relación C/N y C/P sobre HY	125
4.3	CONCLUSIONES PARCIALES DEL CAPITULO 4	128
4.4	RECOMENDACIONES	128
4.5	REFERENCIAS CAPITULO 4	129
<i>Capítulo 5 Acople entre dos reactores anaerobios para la producción conjunta de H₂ y CH₄ con énfasis en el periodo de arranque del reactor metanogénico</i>		<i>134</i>
5.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	134
5.1.1	SUSTRATO	134
5.1.2	INÓCULO Y ACLIMATACIÓN	135
5.1.2.1	Aclimatación y pretratamiento del inóculo-RA.....	135
5.1.2.2	Aclimatación del inóculo-RM	136
5.1.3	UNIDAD EXPERIMENTAL.....	137
5.1.3.1	Reactor Acidogénico - RA	137
5.1.3.2	Reactor Metanogénico - RM	137
5.1.4	SEGUIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE BIOGAS	139
5.1.5	DESCRIPCIÓN DEL ARREGLO EXPERIMENTAL.....	139

5.1.5.1	Evaluación del acople entre un RA y RM para la producción de H_2 y CH_4	139
5.1.6	INOCULACIÓN Y ARRANQUE	140
5.1.6.1	Reactor Acidogénico	140
5.1.6.2	Inoculación y estrategia de arranque del reactor metanogénico	140
5.1.7	OPERACIÓN, SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN	141
5.1.8	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	142
5.1.8.1	Composición del biogás	142
5.1.8.2	Análisis fisicoquímico del sobrenadante	142
5.1.9	CÁLCULOS.....	142
5.1.9.1	Rendimiento de metano (MY).....	142
5.1.10	MANEJO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	142
5.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	143
5.2.1	EVALUACIÓN DE LA FASE ACIDOGÉNICA.....	143
5.2.1.1	Monitoreo de la producción de H_2 en el RA	143
5.2.1.2	Monitoreo de la fase líquida en el RA.....	147
5.2.2	EVALUACIÓN DEL ARRANQUE DEL RM.....	149
5.2.2.1	Composición del afluente RM (Efluente RA).....	150
5.2.2.2	Monitoreo de la fase líquida en el RM	156
5.2.2.3	Monitoreo de la producción de biogás y CH_4 en el RM	167
5.2.3	<i>Selección de la condición de operación del RM para el acople con el RA</i>	171
5.3	CONCLUSIONES PARCIALES DEL CAPÍTULO 5	172
5.4	RECOMENDACIONES	172
5.5	REFERENCIAS DEL CAPITULO 5.....	173
Capítulo 6	Conclusiones finales y recomendaciones	179

Lista de Tablas

Tabla 1.1	Comparación energética de algunas reacciones de la digestión anaerobia de la glucosa	8
Tabla 1.2	Constantes cinéticas de la ecuación de Monod para varios sustratos	9
Tabla 1.3	Diferentes valores de COV y TRH aplicados en el arranque de reactores anaerobios de medio adherido.....	16
Tabla 1.4	Rendimiento de metano en periodos de arranque de reactores anaerobios.....	17
Tabla 1.5	Experiencias relacionadas con desempeño de reactores metanogénicos	21
Tabla 1.6	Diversas condiciones del pretratamiento térmico, ácido y alcalino de inóculos mixtos	24
Tabla 1.7	Valores de pH usados en la producción fermentativa de H_2	25

Tabla 1.8 Antecedentes relacionados con el acople de reactores anaerobios para la producción de biohidrógeno y biometano.....	32
Tabla 1.9 Caracterización fisicoquímica agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca	35
Tabla 3.1 Características fisicoquímicas el sustrato S2 para los experimentos E1 y E2	61
Tabla 3.2 Aclimatación del inóculo	62
Tabla 3.3 Características fisicoquímicas del inóculo aclimatado	62
Tabla 3.4 Caracterización fisicoquímica del inóculo pretratado.....	64
Tabla 3.5. Volumen de lodo y sustrato adicionado en cada reactor.....	65
Tabla 3.6. Volumen de lodo y sustrato adicionado en cada reactor.....	67
Tabla 3.7. Tiempos de toma de muestra de gas - E2.....	68
Tabla 3.8 Actividad Metanogénica Específica en el inóculo	72
Tabla 3.9 Carbohidratos y AGV al inicio y final del experimento, Reducción de AGV y pH final	75
Tabla 3.10 Resumen de los datos obtenidos para la producción acumulada de biogás a diferentes relaciones S/X	82
Tabla 3.11 Valores de los parámetros cinéticos del ajuste al modelo de Gompertz modificado y el efecto de la relación S/X sobre el rendimiento de hidrógeno	85
Tabla 4.1 Características fisicoquímicas el sustrato.....	94
Tabla 4.2 Aclimatación del inóculo	95
Tabla 4.3 Características fisicoquímicas del inóculo aclimatado y pretratado	96
Tabla 4.4 Características de los reactores acidogénicos	98
Tabla 4.5 Dimensiones de los contadores volumétricos de biogás	99
Tabla 4.6 COVe evaluadas.....	100
Tabla 4.7 Caracterización fisicoquímica del inóculo aclimatado-pretratado.....	101
Tabla 4.8 Tasa de producción específica (TPe)	115
Tabla 4.9 Estadística descriptiva de la reducción de sólidos en cada COVe	124
Tabla 4.10 Relación C/N y C/P usadas en algunos procesos de fermentación oscura.....	127
Tabla 5.1 Características fisicoquímicas el sustrato.....	135
Tabla 5.2 Características fisicoquímicas del inóculo-RA aclimatado y pretratado	135
Tabla 5.3 Aclimatación del inóculo-RM.....	136
Tabla 5.4 Características fisicoquímicas del inóculo-RM aclimatado.....	136
Tabla 5.5 Valores de los índices de alcalinidad recomendados para determinar estabilidad en reactores anaerobios	141
Tabla 5.6 Resumen estadístico del desempeño del RA en la fase líquida	149

Tabla 5.7 COV aplicadas al RM en cada TRH durante el periodo de arranque	157
Tabla 5.8 Rendimiento de metano en procesos de DA en dos fases	170
Tabla 5.9 Resumen del BY en el RA y RM	171
Tabla 5.10 Condiciones iniciales de operación y control para el acople entre el RA y RM.....	171

Lista de Figuras

Figura 1.1 Esquema de la DA	7
Figura 1.2 Factores que afectan el arranque de reactores anaerobios	15
Figura 1.3 Cantidad de artículos científicos relacionados con la producción de H ₂ y/o CH ₄ involucrando la digestión anaerobia en una y dos fases.....	29
Figura 1.4 Cantidad de artículos científicos relacionados con la producción de H ₂ y/o CH ₄ involucrando la digestión anaerobia y residuos del proceso de extracción de almidón de yuca ...	37
Figura 3.1 Esquema de preparación del sustrato S2.....	60
Figura 3.2 Unidad experimental.....	63
Figura 3.3 medidor de presión (a) y curva teórica de presión acumulada (b).....	63
Figura 3.4 Toma de muestra de biogás	64
Figura 3.5 Arreglo experimental E1.....	66
Figura 3.6. Arreglo experimental E2.....	68
Figura 3.7 Combinaciones de tratamientos en un diseño 2x3 factorial	70
Figura 3.8 Producción acumulada de biogás (CN 1 atm, 25°C)	73
Figura 3.9 Variación de la temperatura ambiente	74
Figura 3.10 Composición molar del biogás	74
Figura 3.11 Rendimiento máximo de hidrógeno (Y _{max})	76
Figura 3.12 Composición porcentual del biogás.....	77
Figura 3.13 Concentración de DQO y Carbohidratos totales durante la producción de hidrógeno a diferentes relaciones de sustrato: inóculo.....	78
Figura 3.14 Producción de AGV y pH final.....	80
Figura 3.15 Alcalinidad Bicarbonática.....	81
Figura 3.16 Producción acumulada de biogás (Condiciones normales 1 atm, 25°C).....	83
Figura 3.17 Rendimiento de biogás (Condiciones Normales: 1 atm, 25°C).....	84
Figura 3.18 Rendimiento de hidrógeno (Condiciones Normales 1 atm, 25°C)	84
Figura 3.19 Tasa y producción específica de hidrógeno	85
Figura 4.1 Aclimatación del inóculo	95
Figura 4.2 Pretratamiento térmico del inóculo.....	97
Figura 4.3 Esquema de la unidad experimental - Reactor acidogénico	98

Figura 4.4 Contador volumétrico de biogás	99
Figura 4.5 Composición fisicoquímica del afluente.....	108
Figura 4.6 Contenido de nutrientes en el afluente de cada COVe	109
Figura 4.7 Variación de la temperatura ambiente	110
Figura 4.8 Composición del biogás.....	111
Figura 4.9 Rendimiento de biogás.....	111
Figura 4.10 Rendimiento de hidrógeno	112
Figura 4.11 Tasa de producción volumétrica de biogás (PVB) e hidrógeno (PVH).....	113
Figura 4.12 Recuento de bacterias ácido lácticas en los RA.....	114
Figura 4.13 Tasa de producción específica de hidrógeno para cada COVe.....	115
Figura 4.14 Comportamiento del pH para cada COVe	117
Figura 4.15 Comportamiento de la Alcalinidad bicarbonática para cada COVe	117
Figura 4.16 Resumen de la variación del pH según la COVe	117
Figura 4.17 Diagrama de pH en función de la altura del RA.....	118
Figura 4.18 Correlación lineal entre DQO y AGV en el afluente.....	119
Figura 4.19 Variación y reducción de DQO para cada COVe	119
Figura 4.20 Variación y producción de Ácidos grasos volátiles para cada COVe	119
Figura 4.21 Producción de AGV por cada COVe	120
Figura 4.22 Variación y reducción de sólidos totales para cada COVe	121
Figura 4.23 Variación y reducción de sólidos volátiles para cada COVe	121
Figura 4.24 Resumen de ST y SV en el afluente y efluente.....	121
Figura 4.25 Distribución de biomasa en el RA para cada COVe.....	122
Figura 4.26 Biomasa en los RA	123
Figura 4.27 Expansión del lodo en el RA para cada COVe	124
Figura 4.28 Variación del NAT según la COVe	125
Figura 4.29 Variación de Ortofosfatos según la COVe	125
Figura 4.30 Resumen de la variación del Ortofosfatos y NAT según la COVe	127
Figura 5.1 Reactor Metanogénico	138
Figura 5.2 Medio de soporte: anillos en policloruro de vinilo corrugado	138
Figura 5.3 Distribución de flautas verticales en RM.....	138
Figura 5.4 Esquema de la unidad experimental - RA y RM	139
Figura 5.5 Desempeño del RA basado en diferentes variables de respuesta: (a) Composición del biogás, (b) rendimiento de hidrógeno (HY) y reducción de carbohidratos (η), (c) Carga orgánica	

volumétrica específica (COVe) y tasa de producción volumétrica de hidrógeno (PVH), y (d) Box-plot de H ₂ (%), HY, PVH y COVe.....	144
Figura 5.6 Comportamiento del pH al interior del RA	144
Figura 5.7 Distribución de biomasa dentro del RA.....	146
Figura 5.8 Biomasa retirada en el RA	146
Figura 5.9 Evolución de la formación de gránulos en el RA	147
Figura 5.10 Comportamiento de los AGV	148
Figura 5.11 Comportamiento de la DQO	149
Figura 5.12 Variación del pH en el efluente del RA y afluente al RM.....	150
Figura 5.13 Variación de la alcalinidad bicarbonática (AB) en el efluente del RA y afluente al RM	151
Figura 5.14 Variación de los AGV en el efluente RA y afluente RM	152
Figura 5.15 Variación de la DQO en el efluente RA y afluente RM	152
Figura 5.16 Correlación lineal entre DQO y AGV	153
Figura 5.17 Variación de sólidos en el efluente RA y afluente RM. (a) Sólidos Totales (ST), (b) Sólidos Volátiles (SV) y (c) Sólidos Suspendedos Totales (SST).....	154
Figura 5.18 Distribución de sólidos en el afluente RM.....	154
Figura 5.19 Aporte de sales por adición de bicarbonato de sodio.....	155
Figura 5.20 Nutrientes disponibles en el afluente RM.....	156
Figura 5.21 Variación del pH.....	158
Figura 5.22 Variación de la AB	159
Figura 5.23 Comportamiento de los AGV. (a) Variación de los AGV afluente y efluente en todo el periodo de evaluación y (b) Variación de AGV en cada TRH.....	160
Figura 5.24 Variación del índice buffer	161
Figura 5.25 Variación del índice AI/AP.....	162
Figura 5.26 Variación del Índice α	163
Figura 5.27 Variación de la carga orgánica. (a) Comportamiento de la DQO afluente y efluente, (b) Carga de DQO en cada TRH y (c) Reducción de carga de DQO en cada TRH	164
Figura 5.28 Correlación lineal entre DQO y AGV en el afluente RM en los TRH de 17, 16 y 13 h	165
Figura 5.29 Variación de la carga de sólidos. (a) comportamiento de los SST afluente y efluente, (b) Carga de SST aplicada en cada TRH y (c) Reducción de carga de SST en cada TRH.....	166
Figura 5.30 Biomasa adherida (izquierda) e intersticial (derecha)	167
Figura 5.31 Indicadores del desempeño del RM. (a) Composición del biogás y (b) Producción volumétrica de biogás (PVB)	168
Figura 5.32 Burbujas de biogás atrapadas em el medio de soporte	169

Figura 5.33 Rendimiento de metano (MY) y rendimiento de biogás (BY)	170
---	-----

Lista de Abreviaturas

AME:	Actividad Metanogénica Específica
AB:	Alcalinidad bicarbonática
AI:	Alcalinidad intermedia
AP:	Alcalinidad parcial
AT:	Alcalinidad total
BAL:	Bacterias ácido lácticas
BCH:	Bacterias consumidoras de hidrógeno
BPH:	Bacterias productoras de hidrógeno
BY:	<i>Biogas yield</i> - Rendimiento de biogás
CH:	Carbohidratos totales
COV:	Carga orgánica volumétrica
COVe:	Carga orgánica volumétrica específica
Qbiogás:	Caudal de biogás
QMH₂:	Caudal molar de hidrógeno
CSTR:	<i>Continuous stirred tank reactor</i>
DA:	Digestión anaerobia
FA:	Filtro anaerobio
GPH:	Gránulos productores de hidrógeno
HY:	<i>Hydrogen yield</i> - Rendimiento de hidrógeno
IB:	Índice bufer
MO:	Materia orgánica
MY:	Rendimiento de metano
RA:	Reactor acidogénico
RM:	Reactor metanogénico
SVT:	Sólidos volátiles totales
SPE:	Sustancias poliméricas extracelulares
TPe:	Tasa de producción específica de hidrógeno
PVB:	Tasa de producción volumétrica de biogás
PVH:	Tasa de producción volumétrica de hidrógeno
TRC:	Tiempo de retención celular
TRH:	Tiempo de retención hidráulico
UASB:	<i>Upflow anaerobic sludge blanket reactor</i>

Introducción

Actualmente, el suministro de energía a nivel mundial se realiza a través de la explotación de recursos naturales no renovables como petróleo, carbón y gas natural (Shafiee y Topal, 2009). En el año 2017, se consumieron 13.511 Mtoe (millones de toneladas de energía equivalentes a petróleo) de las cuales 34,2% fue suministrado por petróleo, 27,6% por carbón, 23,4% por gas natural y 14,8% restante a través de otras fuentes (BP, 2018). Este esquema de suministro que depende de la explotación de combustibles fósiles representa no solo una amenaza para la duración de las reservas de recursos naturales no renovables (Owen *et al.*, 2010) sino que aumenta las emisiones de CO₂, que después de tres años de estabilización, se incrementaron en 1,3% en el año 2017 debido al crecimiento en el uso de carbón y al crecimiento sostenido en el uso de petróleo y gas natural (Olivier y Peters, 2018).

Bajo este escenario, las fuentes alternativas de energía limpia como los biocombustibles han despertado un gran interés en los últimos años, debido a que pueden evitar la emisión de gases de efecto invernadero y además, pueden producirse a partir de recursos renovables como biomasa o residuos orgánicos (Asif y Muneer, 2007, López 2011, Orhan *et al.*, 2012). Entre los biocombustibles el hidrógeno (H₂) es altamente prometedor debido a que se convierte fácilmente en electricidad a través de celdas de combustible (Yu y Takahashi, 2007) y su combustión limpia libera gran cantidad de energía por unidad de masa (122 kJ.g⁻¹) (Castelló *et al.*, 2009). A diferencia de los procesos convencionales de producción de hidrógeno (por ejemplo, electrólisis del agua y reformado con vapor), la fermentación oscura de residuos orgánicos, incluidos biomasa y agua residual, es una tecnología limpia y ambientalmente amigable (Acar y Dincer, 2014). Sus principales ventajas son (i) *ahorro de energía debido a que puede llevarse a cabo a temperatura y presión ambiente por lo que no necesita el suministro de fuentes externas de energía* (Li y Fang, 2007, Castelló *et al.*, 2009, Hallenbeck, 2009, Hallenbeck *et al.*, 2012), (ii) *protección del medio ambiente debido a que permite el uso residuos orgánicos ofreciendo otra alternativa para su gestión ambiental* (Won y Lau, 2011) y (iii) *huella de carbono cero* (Ruggeri *et al.*, 2010).

La fermentación oscura es un proceso biológico semejante a la acidogénesis que ocurre dentro de la digestión anaerobia (DA), en la cual el H₂ se produce juntamente con los ácidos grasos volátiles (AGV). Esta tecnología aún sigue evolucionando y la producción continua y estable de hidrógeno a largo plazo representa su principal desafío (Mota *et al.*, 2018). En teoría, el rendimiento máximo de H₂ en la fermentación oscura es de 4,0 mol H₂.mol⁻¹ de glucosa cuando el ácido acético es el único AGV producido, 2,0 mol H₂.mol⁻¹ cuando se produce ácido butírico y 1,0 mol H₂.mol⁻¹, si el ácido propiónico es el único AGV formado (Luo *et al.*, 2010a). No obstante, en la práctica se obtienen bajos rendimientos de H₂ (HY) los cuales son atribuidos principalmente, al crecimiento microbiano (producción de biomasa), uso del sustrato en rutas metabólicas que no producen H₂ y consumo del H₂ producido (Reddy *et al.*, 2017, Mota *et al.*, 2018).

En la actualidad, la optimización de parámetros ambientales y operacionales que permitan mantener las rutas metabólicas de producción de H₂ y evitar su consumo, con el objetivo de mejorar el HY, son los focos principales en los que se centra la investigación en torno a la producción fermentativa de hidrógeno. Aunque se han identificado una amplia gama de factores que afectan la producción biológica de hidrógeno, el pH ambiental, el pretratamiento del inóculo y el control de la biomasa tienen un efecto superlativo sobre el HY.

Debido a la propia naturaleza de la fermentación oscura, la producción continua de AGV modifica constantemente el pH del medio, obligando a las bacterias productoras de hidrógeno (BPH) a cambiar su metabolismo para protegerse de un ambiente muy ácido que puede afectar su crecimiento (Jung *et al.*,

2011b). También, estimula la acumulación de AGV que en su forma no disociada puede provocar la lisis celular por estrés iónico (Wang *et al.*, 2008, Castro-Villalobos *et al.*, 2012a). De acuerdo con Grimmer *et al.* (2011) las BPH establecen su crecimiento tipo acidogénico a pH 5,8. Sin embargo, este valor puede variar conforme al tipo de sustrato utilizado en la fermentación. De esta manera se han utilizados pH de fermentación entre 7,0 y 4,3 con sustratos sintéticos (ej. glucosa, sacarosa y xilosa) y reales (lactosuero y vinazas entre otros) (Fang y Liu, 2002, Khanal, 2003, Buitron *et al.*, 2014, Castelló *et al.*, 2018); incluso, se ha reportado la producción de hidrógeno a pH 2,7, ampliando el rango de pH para la fermentación oscura (Mota *et al.*, 2018). Por lo tanto, frente al uso de sustratos reales subyace la necesidad de acotar un rango específico de pH que mejore el HY para cada uno.

Por su parte, los diferentes métodos de pretratamiento del inóculo que tienen como propósito la eliminación inicial de bacterias consumidoras (BCH), para permitir el uso de inóculos mixtos en la fermentación oscura y evitar el consumo del hidrógeno producido, afectan de diferente manera la estructura y productividad de las BPH (Dessi *et al.*, 2018). En algunos casos se ha reportado que el pretratamiento térmico mejora significativamente el HY frente a otros métodos, por ej. pretratamiento ácido, alcalino o secado frío (Goud *et al.*, 2014, Kumari y Das, 2017). Mientras que otros autores recomiendan el uso del pretratamiento ácido (Yang y Wang, 2018), acetileno (Valdez-Vazquez *et al.*, 2006) o aireación del inóculo (Ren *et al.*, 2008). Frecuentemente, las investigaciones que comparan los diferentes métodos para inactivar a las BCH, concluyen que los pretratamientos del inóculo inducen diferencias en las comunidades microbianas, y pueden ser directamente responsables de los diferentes tipos de fermentación y HY (Bundhoo *et al.*, 2015, Yang y Wang, 2018), por lo que la selección de una u otra metodología podría depender del efecto sinérgico de esta con otros factores.

Recientemente se ha establecido que el crecimiento excesivo de biomasa dentro de los reactores hidrogenogénicos tiene un efecto contrario sobre el HY, debido a que genera un desbalance entre las reacciones catabólicas y anabólicas. En sistemas de flujo discontinuo, la proporción entre el sustrato y los microorganismos (biomasa), es denominada relación S/X y en sistemas de flujo continuo, se conoce como carga orgánica volumétrica específica (COVe). Esta relación afecta directamente los patrones de crecimiento de los microorganismos (Liu, 1996) y por lo tanto, controlar su valor evitaría el crecimiento excesivo de la biomasa. En sistemas discontinuos, la relación S/X ha sido aplicada para obtener inóculos enriquecidos con BPH. Se han explorado valores entre 0,5 y 8,0 g DQO. g⁻¹ SSV usando sustratos sintéticos (ej. sacarosa) y sustratos reales de mayor complejidad como vinaza (Nasr *et al.*, 2011), residuos de alimentos, yuca, lácteos, cítricos (Lucas *et al.*, 2015) y bagazo de caña de azúcar hidrolizado (Reddy *et al.*, 2017). En sistemas de flujo continuo, autores como Anzola-Rojas *et al.* (2015) indican que la disminución continua de la COVe causada por la acumulación sistemática de la biomasa, afecta la generación de biogás y que una COVe de 6,0 g sacarosa. g⁻¹ SSV.d⁻¹ es necesaria para mantener la estabilidad en el sistema. Por su parte, Hafez *et al.* (2010b) sostienen que la relación inversa entre la producción de biomasa y HY complica el diseño de los reactores biohidrogenadores y sugieren una COVe entre 4,4 a 6,4 g DQO.g⁻¹ SSV.d⁻¹ para mantener un balance adecuado entre estos parámetros. Ramírez-Morales *et al.* (2015) confirman que tanto el rendimiento de biomasa como el HY son funciones de la COVe, nombrada en su estudio como relación F/M. Además, afirman que el coeficiente de producción de biomasa no es constante y depende de la COVe, incluso para valores altos que oscilan entre 20 y 80 g DQO.g⁻¹ SSV.d⁻¹.

Aunque los resultados aún no son consistentes debido a que tanto altas como bajas relaciones S/X mejoran el HY, los estudios coinciden al demostrar que la relación S/X influye en el HY y que probablemente, para cada sustrato hay un rango en el cual la relación S/X mejora el HY. Sin embargo, en la práctica el control de la biomasa implica un gran desafío debido a la dificultad que representa su cuantificación, y es por eso que los estudios que involucran reactores de crecimiento adherido en su mayoría, determinan la COVe al final del periodo de evaluación. Por el contrario, en reactores de crecimiento

suspendido o auto-inmovilizado la determinación del contenido de biomasa se facilita. No obstante, en este tipo de reactores se pierde la ventaja que ofrecen los reactores de crecimiento adherido, relacionada con el desacople entre el tiempo de retención hidráulico (TRH) y el tiempo de retención celular. Por lo que, encontrar un balance entre la COVe y el HY usando reactores anaerobios de crecimiento suspendido, resultaría de gran interés en la optimización de parámetros ambientales que permitan la producción continua y estable de hidrógeno.

Por otro lado, la fermentación oscura genera un efluente rico en AGV los cuales por su alto contenido de materia orgánica y bajos valores de pH pueden causar problemas ambientales (Tao *et al.*, 2007). Por lo tanto, estos efluentes deben someterse a otros procesos para completar la transformación de los contaminantes orgánicos. Entre las diversas alternativas, la metanogénesis que es un proceso de reducción de carbono ha sido aplicado con éxito para estabilizar y valorizar los efluentes acidogénicos a través de la producción de metano (Ruggeri *et al.*, 2010), el cual es usado en sectores de transporte y energía (Kumar *et al.*, 2018), puede enviarse a la red de gas natural o usar como biocombustible en el sector automotriz (Molino *et al.*, 2013).

La DA de forma natural a través de la cooperación microbiana, integra la fermentación oscura (acidogénesis) con la metanogénesis, por lo que, incorporando la optimización de parámetros ambientales y operacionales orientados a mejorar el HY y utilizando todo el amplio conocimiento relacionado con la DA es probable que esta herramienta tecnológica permita entregar mayores avances en torno al producción continua de hidrógeno y metano a partir de sustratos reales (Ueno *et al.*, 2007, Gomez *et al.*, 2011, Peña-Muñoz y Steinmetz, 2012). Los residuos ricos en materia orgánica tienen un alto potencial para impulsar la producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura. El agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca es un residuo que por sus características fisicoquímicas representa una alta toxicidad para los ecosistemas acuáticos y su vertimiento, puede conducir a la pérdida de recursos naturales no renovables (Gottret *et al.*, 1997, Sarriá, 2012a). Sin embargo, por su contenido de carbohidratos fermentables este residuo es caracterizado como un sustrato potencial para la producción biológica de hidrógeno, mejorando la sostenibilidad de proceso agroindustrial (Torres *et al.*, 2017).

Por todo lo anterior, el objetivo principal de esta investigación fue evaluar condiciones operacionales para el acople entre un reactor anaerobio de medio suspendido y un reactor anaerobio de crecimiento adherido para la producción de hidrógeno y metano a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. Con base en el objetivo principal, se formularon tres objetivos específicos que contribuyeron individualmente a su resolución. El primer objetivo específico fue evaluar la influencia del pretratamiento del inóculo, pH inicial y la relación sustrato:inóculo en la producción biológica de hidrógeno. El segundo, fue evaluar la influencia de la COVe sobre el HY a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca en condiciones de flujo continuo y el tercero, investigar el uso del efluente de un reactor acidogénico para la producción de metano a través del acople entre un reactor acidogénico (RA) y un reactor metanogénico (RM) simulando un proceso de DA en dos fases, con énfasis en el periodo de arranque del RM.

La tesis doctoral fue estructurada a través de 5 capítulos principales y un capítulo final de conclusiones generales y recomendaciones. En el capítulo 1 se presenta una revisión bibliográfica en torno al tema principal de la investigación recolectando información relacionada con las variables de operación de la DA en dos fases y fermentación oscura, así como conceptos y teorías necesarios para la contextualización de la investigación. En el Capítulo 2 se presentan los objetivos principales y específicos que motivaron esta investigación. Después en los capítulos 3, 4 y 5 se abordan individualmente los tres objetivos específicos previamente señalados, detallando la metodología implementada seguida de un ítem de discusión de resultados, conclusiones y recomendaciones parciales. Cada capítulo fue acompañado de su

bibliografía. Finalmente, en el capítulo 6 se presentan las principales conclusiones en torno a la investigación y recomendaciones para estudios futuros.

REFERENCIAS DE LA INTRODUCCIÓN

- ACAR, C. & DINCER, I. (2014). Comparative assessment of hydrogen production methods from renewable and non-renewable sources. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, 1-12.
- ANZOLA-ROJAS, M. D. P.; GONCALVES DA FONSECA, S.; CANEDO DA SILVA, C.; MAIA DE OLIVEIRA, V. & ZAIAT, M. (2015). The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. *Biotechnol Rep (Amst)*, 5, 46-54.
- ASIF, M. & MUNEER, T. (2007). Energy supply, its demand and security issues for developed and emerging economies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 11, 1388-1413.
- BP (2018). BP: statistical review of world energy 2017. London: British Petroleum.
- BITTRON, G.; PRATO-GARCIA, D. & ZHANG, A. (2014). Biohydrogen production from tequila vinasses using a fixed bed reactor. *Water Sci Technol*, 70, 1919-25.
- 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.
- CASTELLÓ, E.; BRAGA, L.; FUENTES, L. & ETCHEBEHERE, C. (2018). Possible causes for the instability in the H₂ production from cheese whey in a CSTR. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43, 2654-2665.
- CASTELLÓ, E.; GARCÍA Y SANTOS, C.; IGLESIAS, T.; PAOLINO, G.; WENZEL, J.; BORZACCONI, L. & ETCHEBEHERE, C. (2009). Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 5674-5682.
- CASTRO-VILLALOBOS, M.; GARCÍA-MORALES, J. & FERNÁNDEZ, F. (2012a). By-products inhibition effects on bio-hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 7077-7083.
- DESSÌ, 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, 9233-9245.
- FANG, H. H. & LIU, H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresour Technol*, 82, 87-93.
- GOMEZ, X.; FERNANDEZ, C.; FIERRO, J.; SANCHEZ, M.; ESCAPA, A. & MORAN, A. (2011). Hydrogen production: two stage processes for waste degradation. *Bioresource Technology*, 102, 8621-7.
- GOTTRET, M. V.; HENRY, G. & DUFOUR, D. (1997). Caracterización de la agroindustria de procesamiento de almidón agro en el departamento del Cauca, Colombia. *Proyecto de Desarrollo de Agroempresas Rurales, CIAT*.
- GOUD, R. K.; SARKAR, O. & MOHAN, S. V. (2014). Regulation of biohydrogen production by heat-shock pretreatment facilitates selective enrichment of *Clostridium* sp. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, 7572-7586.

- GRIMMLER, C.; JANSSEN, H.; KRAUBE, D.; FISCHER, R.; BAHL, H.; DÜRRE, P.; LIEBL, W. & EHRENREICH, A. (2011). Genome-wide gene expression analysis of the switch between acidogenesis and solventogenesis in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 20, 1-15.
- HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; NAGGAR, M. H. E.; ELBESHBISHY, E. & BAGHCHEHSARAEI, B. (2010b). Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *International journal of hydrogen energy*, 35, 81-92.
- HALLENBECK, P. (2009). Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Energy and Environment*, 34, 7379-7389.
- HALLENBECK, P.; ABO-HASHESH, M. & GHOSH, D. (2012). Strategies for improving biological hydrogen production. *Bioresource Technology*, 110, 1-9.
- JUNG, K.; KIM, D.; KIM, S. & SHIN, H. (2011b). Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresource technology*, 102, 8612-20.
- KHANAL, S. (2003). Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 1123-1131.
- KUMAR, G.; SHOBANA, S.; NAGARAJAN, D.; LEE, D.-J.; LEE, K.-S.; LIN, C.-Y.; CHEN, C.-Y. & CHANG, J.-S. (2018). Biomass based hydrogen production by dark fermentation—recent trends and opportunities for greener processes. *Current opinion in biotechnology*, 50, 136-145.
- KUMARI, S. & DAS, D. (2017). Improvement of biohydrogen production using acidogenic culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 4083-4094.
- LI, C. & FANG, H. (2007). Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37, 1-39.
- LIU, Y. (1996). Bioenergetic interpretation on the S₀X₀ ratio in substrate-sufficient batch culture. *Water Research*, 30, 2766-2770.
- LÓPEZ, J. (2011). Microbiología de la producción de hidrógeno. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*, 8, 201-204.
- LUCAS, S. D. M.; PEIXOTO, G.; MOCKAITIS, G.; ZAIAT, M. & GOMES, S. D. (2015). Energy recovery from agro-industrial wastewaters through biohydrogen production: Kinetic evaluation and technological feasibility. *Renewable Energy*, 75, 496-504.
- LUO, G.; XIE, L.; ZOU, Z.; WANG, W. & ZHOU, Q. (2010a). Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. *Bioresour Technol*, 101, 959-64.
- MOLINO, A.; NANNA, F.; DING, Y.; BIKSON, B. & BRACCIO, G. (2013). Biomethane production by anaerobic digestion of organic waste. *Fuel*, 103, 1003-1009.
- MOTA, V. T.; FERRAZ JUNIOR, A. D. N.; TRABLY, E. & ZAIAT, M. (2018). Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible? *Water Res*, 128, 350-361.
- NASR, N.; ELBESHBISHY, E.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G. & EL NAGGAR, M. H. (2011). Bio-hydrogen production from thin stillage using conventional and acclimatized anaerobic digester sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 12761-12769.
- OLIVIER, J. G. & PETERS, J. A. (2018). Trends in global CO₂ and total greenhouse gas emissions: 2018 Report *Environmental Sciences*.
- ORHAN, M.; DINCER, I.; ROSEN, M. & KANOGLU, M. (2012). Integrated hydrogen production options based on renewable and nuclear energy sources. *Renewable and sustainable energy reviews*, 16, 6059-6082.

- OWEN, N.; INDERWILDI, O. & KING, D. (2010). The status of conventional world oil reserves—Hype or cause for concern? *Energy Policy*, 38, 4743-4749.
- PEÑA-MUÑOZ, K. & STEINMETZ, H. (2012). Evaluation of Pre-treatment on the First Stage of an Anaerobic Digester for Enhancing Bio-hydrogen Production and its Associated Energy Balance. *Energy Procedia*, 29, 469-479.
- RAMÍREZ-MORALES, J. E.; TORRES ZÚÑIGA, I. & BUITRÓN, G. (2015). On-line heuristic optimization strategy to maximize the hydrogen production rate in a continuous stirred tank reactor. *Process Biochemistry*, 50, 893-900.
- REDDY, K.; NASR, M.; KUMARI, S.; KUMAR, S.; GUPTA, S. K.; ENITAN, A. M. & BUX, F. (2017). Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate: effects of pH, S/X, Fe 2+, and magnetite nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 8790-8804.
- REN, N.; GUO, W.; WANG, X.; XIANG, W.; LIU, B.; WANG, X.; DING, J. & CHEN, Z. (2008). Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4318-4324.
- RUGGERI, B.; TOMMASI, T. & SASSI, G. (2010). Energy balance of dark anaerobic fermentation as a tool for sustainability analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 10202-10211.
- SARRIÁ, H. (2012a). *Contaminación y toxicidad de las aguas residuales de las rallanderías del Norte del Cauca, Colombia*. Doctor, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.
- SHAFIEE, S. & TOPAL, E. (2009). When will fossil fuel reserves be diminished? *Energy Policy*, 37, 181-189.
- TAO, Y.; CHEN, Y.; WU, Y.; HE, Y. & ZHOU, Z. (2007). High hydrogen yield from a two-step process of dark- and photo-fermentation of sucrose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 200-206.
- TORRES, D. G. B.; LUCAS, S. D. M.; ANDREANI, C. L.; CARVALHO, K. Q. D.; 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, 160-172.
- UENO, Y.; FUKUI, H. & GOTO, M. (2007). Operation of a two-stage fermentation process producing hydrogen and methane from organic waste. *Environmental science & technology*, 41, 1413-1419.
- VALDEZ-VAZQUEZ, I.; RIOS-LEAL, E.; MUNOZ-PAEZ, K. M.; CARMONA-MARTINEZ, A. & POGGI-VARALDO, H. M. (2006). Effect of inhibition treatment, type of inocula, and incubation temperature on batch H₂ production from organic solid waste. *Biotechnol Bioeng*, 95, 342-9.
- WANG, B.; WAN, W. & WANG, J. (2008). Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 7013-7019.
- WON, S. & LAU, A. (2011). Effects of key operational parameters on biohydrogen production via anaerobic fermentation in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, 102, 6876-6883.
- YANG, G. & WANG, J. (2018). Kinetics and microbial community analysis for hydrogen production using raw grass inoculated with different pretreated mixed culture. *Bioresource Technology*, 247, 954-962.
- YU, J. & TAKAHASHI, P. (2007). Biophotolysis-based Hydrogen Production by Cyanobacteria and Green Microalgae. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, Microbiology Series, vol. 1., 79-89.

Capítulo 1 Revisión de literatura

1.1 FUNDAMENTOS DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

La digestión anaerobia (DA) más que un proceso biológico es un sistema ecológico dirigido secuencialmente por tres diferentes grupos fisiológicos de microorganismos: i) *bacterias fermentativas (o acidogénicas)*; ii) *bacterias sintróficas (o acetogénicas)*; y iii) *microorganismos metanogénicos*. De la participación secuencial de estos microorganismos se deriva el nombre de las cuatro etapas, en las que tradicionalmente se ha dividido la DA: *hidrólisis*, *acidogénesis*, *acetogénesis* y *metanogénesis*. El objetivo primario de la DA es la degradación secuencial, en ausencia de oxígeno, de la materia orgánica (MO) hasta transformarla a través de procesos biológicos en una mezcla gaseosa, conocida como biogás, constituida principalmente por metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2), y en menor cantidad por hidrógeno (H_2), nitrógeno (N_2) y sulfuro de hidrógeno (H_2S) (Chernicharo, 2007). En la Figura 1.1 se presenta un diagrama simplificado de la DA. La primera etapa tiene como objetivo la hidrólisis o descomposición de grandes macromoléculas de proteínas, grasas y polímeros de carbohidratos (ej. celulosa, almidón) en monómeros solubles (aminoácidos, ácidos grasos de cadena larga y azúcares) capaces de atravesar la membrana celular; esta transformación ocurre gracias a las enzimas hidrolíticas extracelulares (ej. celulosa, proteasa y lipasa) liberadas por bacterias facultativas y anaerobias estrictas (Hallenbeck y Benemann, 2002, von Sperling y Chernicharo, 2005, Weedermann *et al.*, 2013).

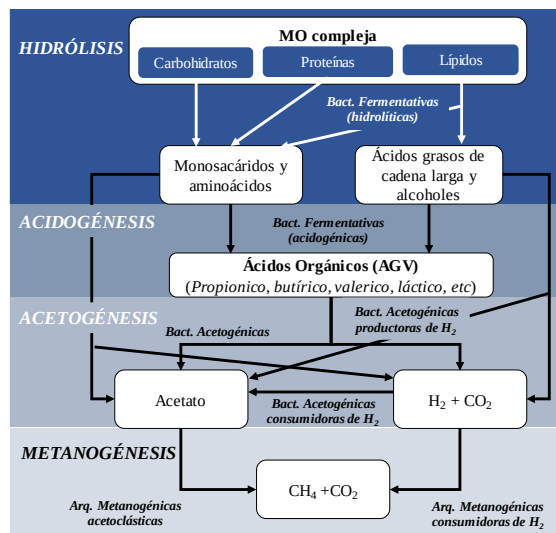


Figura 1.1 Esquema de la DA

Adaptado de: Gujer y Zehnder (1983), von Sperling y Chernicharo (2005) y Weedermann *et al.* (2013)

Durante la **acidogénesis**, los monómeros solubles son fermentados en ácidos grasos de cadena corta (C1 – C5) comúnmente denominados ácidos grasos volátiles (AGV), principalmente ácido láctico, valérico, propiónico, butírico y acético, así como en alcoholes, H_2 y CO_2 . Posteriormente, en la **acetogénesis**, las bacterias homoacetogénicas consumen los productos de la fermentación y generan ácido acético, H_2 y CO_2 ; este grupo de bacterias puede cambiar su metabolismo autotrófico a heterotrófico dependiendo de la disponibilidad de los sustratos, de esta manera, algunas son identificadas como bacterias acetogénicas-productoras obligadas de H_2 y otras como bacterias acetogénicas-consumidoras de H_2 . Finalmente, las arqueas metanogénicas, las cuales son estrictamente anaerobias, consumen el acetato, H_2 y una parte del

CO₂ para producir CH₄; las dos rutas bioquímicas usadas principalmente en la **metanogénesis** son: (i) ruta acetotrófica ($4\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow 4\text{CO}_2 + 4\text{CH}_4$) y (ii) ruta hidrogenotrófica ($\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$) (Dinamarca *et al.*, 2011, Abbasi *et al.*, 2012).

Existen grandes diferencias entre los grupos microbianos que dirigen el sistema, las cuales le otorgan a la DA una complejidad en términos químicos y microbiológicos. Un aspecto relevante de la degradación anaerobia de la MO, es la forma como la cooperación microbiana permite superar las limitaciones termodinámicas de la DA. En la Tabla 1.1 se presenta una comparación energética de algunas reacciones comunes en la DA, donde se observa que la acetogénesis y metanogénesis son las etapas más críticas. Sin embargo, ellas ocurren de forma natural en reactores anaerobios, gracias a la interacción entre microorganismos acetogénicos (*bacterias oxidantes de propionato y butirato*) y metanogénicos (*arqueas hidrogenotróficas y acetoclásticas*). Los productos intermediarios sintróficos más importantes son ácido propiónico (HPr) y ácido butírico (HBu) y su oxidación es considerada como el paso limitante, debido a las restricciones termodinámicas ($\Delta G^\circ_{\text{propionato}} = +76,1$ y $\Delta G^\circ_{\text{butirato}} = +48,1$ kJ.mol⁻¹ a 25°C). En consecuencia, la degradación anaerobia de HPr y HBu sólo se puede lograr a través de la cooperación sintrófica entre *bacterias oxidantes de propionato y butirato* y *bacterias consumidoras de H₂/formiato*, las cuales mantienen una baja presión de hidrógeno (Amani *et al.*, 2011).

Tabla 1.1 Comparación energética de algunas reacciones de la digestión anaerobia de la glucosa

Etapa	Reacción	ΔG° kJ.mol ⁻¹
Acidogénesis	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 4\text{H}_2$ <i>glucosa</i> <i>acetato</i>	-206
	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{H}_2 \rightarrow 2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+$ <i>glucosa</i> <i>propionato</i>	-358
	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{CO}_2 + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$ <i>glucosa</i> <i>butirato</i>	-255
Acetogénesis	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3\text{H}_2$ <i>propionato</i> <i>acetato</i>	+76,1
	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 3\text{HCOO}^-$ <i>propionato</i> <i>acetato</i>	+72,2
	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$ <i>butirato</i> <i>acetato</i>	+48,1
Homoacetogenesis	$4\text{H}_2 + 2\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$ <i>hidrógeno</i> <i>acetato</i>	-100
Metanogénesis	$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$ <i>acetato</i> <i>metano</i>	-31
	$\text{H}_2 + \frac{1}{4}\text{HCO}_3^- + \frac{1}{4}\text{H}^+ \rightarrow \frac{1}{4}\text{CH}_4 + \frac{3}{4}\text{H}_2\text{O}$ <i>hidrógeno</i> <i>metano</i>	-33,9
	$\text{HCOO}^- + \frac{1}{4}\text{H}_2\text{O} + \frac{1}{4}\text{H}^+ \rightarrow \frac{1}{4}\text{CH}_4 + \frac{3}{4}\text{HCO}_3^-$ <i>formiato</i> <i>metano</i>	-32,6

Fuente: Drake *et al.* (2002) y Aquino y Chernicharo (2005a)

La cinética de crecimiento es otra diferencia importante entre los grupos microbianos que dirigen la DA. En la Tabla 1.2 se observa que las bacterias acidogénicas presentan tasas de crecimiento que superan ampliamente las tasas de crecimiento de los otros microorganismos involucrados en el proceso. En condiciones de sobre carga orgánica, esta es una de las causas de desequilibrio o inestabilidad de los sistemas anaerobios, ya que la producción de metabolitos intermediarios (ej. AGVs y acetato) supera su consumo (Aquino y Chernicharo, 2005a).

Tabla 1.2 Constantes cinéticas de la ecuación de Monod para varios sustratos

Sustrato	Etapas	k (g DQO.g ⁻¹ SSV.d ⁻¹)	K _s (mg DQO.L ⁻¹)	μ _{max} (d ⁻¹)
Carbohidratos	Acidogénesis	1,33 a 70,6	22,5 a 630	7,2 a 30
AGV	Acetogénesis	6,2 a 17,1	12 a 500	0,13 a 1,20
Acetato	Metanogénesis Acetoclastica	2,6 a 11,6	11 a 421	0,08 a 0,7
H ₂ /CO ₂	Metanogénesis hidrogenotrófica	1,92 a 90	4,8 x 10 ⁻⁵ a 0,6	0,05 a 4,07

k: tasa máxima específica de utilización del sustrato; K_s: constante de saturación; μ_{max}: tasa máxima de crecimiento específico

Fuente: Aquino y Chernicharo (2005)

1.2 REQUERIMIENTOS AMBIENTALES, VARIABLES DE CONTROL Y OPERACIÓN

El crecimiento microbiano es influenciado por las características físicas y químicas del ambiente. La DA es particularmente susceptible a un riguroso control de las condiciones ambientales, debido a que el proceso requiere de la interacción de microorganismos fermentativos y metanogénicos, y su éxito depende de un balance adecuado del sistema ecológico (Chernicharo, 1997b).

1.2.1 pH, ALCALINIDAD Y CAPACIDAD “BUFFER”

El pH ideal para la DA se encuentra en un rango muy estrecho, entre pH 6,8 y 7,2. Este rango ha sido establecido en función de los microorganismos metanogénicos, debido a que su tasa de crecimiento se reduce considerablemente por debajo de pH 6,6 (Mosey y Fernandes, 1988) y, un pH excesivamente alcalino puede potencialmente provocar la desintegración de los gránulos microbianos con la subsiguiente falla del proceso (Franke-Whittle *et al.*, 2014). El pH óptimo para cada una de la etapas de la DA es diferente entre sí; para la hidrólisis y acidogénesis el rango está entre 5,2 y 6,3 y, para la acetogénesis y metanogénesis esta entre 6,7 y 7,5 (Sandberg y Ahring, 1992, Oechsner *et al.*, 2010).

Los AGV producidos durante la DA tienden a reducir el pH. Esta reducción es normalmente contrarrestada por la actividad de las arqueas metanogénicas, las cuales producen alcalinidad en forma de CO₂, amonio y bicarbonato (Appels *et al.*, 2008). No obstante, las diferencias cinéticas entre los microorganismos acidogénicos, acetogénicos y metanogénicos puede resultar en un desequilibrio entre la producción y consumo de AGV, ocasionando la acumulación de CO₂, H₂ y ácido acético, y la producción de AGV más reducidos (ej. propionato y butirato). La acumulación de estos subproductos acidogénicos contribuye al consumo de alcalinidad y decrecimiento de pH, afectando de una forma negativa, principalmente el crecimiento de acetógenos y arqueas metanogénicas, dando como resultado la falla del proceso (Chernicharo, 1997b). Por lo tanto, es común en la DA el suministro de alguna sustancia con capacidad amortiguadora o “buffer” que impida la caída del pH.

La capacidad “buffer” es un concepto de la Química que describe cuanto ácido o base puede absorber una solución sin modificar significativamente su pH. A menudo, en la DA la capacidad “buffer” también conocida como capacidad tampón o capacidad de amortiguación hace alusión a la alcalinidad que resulta del equilibrio entre el dióxido de carbono y el ion bicarbonato. Este sistema es el principal sistema ácido-base que proporciona en la DA, resistencia a cambios rápidos y significativos en el pH, por lo tanto, la capacidad “buffer” es proporcional a la concentración de bicarbonato (Ward *et al.*, 2008). La importancia del sistema carbonato frente a otros sistemas ácido-base para regular el pH en la DA radica en que su capacidad “buffer” es alta precisamente en el rango de pH que es requerido para la metanogénesis ($6,3 < \text{pH} < 7,8$ aproximadamente) (van Haandel, 1994).

Las sustancias usadas como “buffer” pertenecen a dos grupos: (i) Las que ofrecen alcalinidad bicarbonática directamente (NaHCO_3 , NH_4HCO_3) y (ii) Las que reaccionan con el gas carbónico para formar alcalinidad bicarbonática (NaOH , CaO , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NH_3). El bicarbonato de sodio (NaHCO_3) es una sal comúnmente empleada para aportar capacidad buffer y mantener el pH en niveles deseados. Show *et al.* (2004) en un estudio con agua residual sintética usaron una relación DQO: HCO_3^- de 1,67:1 para regular el pH entre 6,5 y 7,3. Torres *et al.* (2005a) recomiendan la adición de NaHCO_3 con una relación DQO: HCO_3^- de 1:1 para generar alcalinidad bicarbonática y estabilizar el pH en la DA de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. Por su parte, Appels *et al.* (2008) siguieron mantener una capacidad “buffer” de 70 meq $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ o una relación molar de 1,4:1 de bicarbonato/AGV y hacen énfasis en que es más importante la estabilidad de la relación bicarbonato/AGV que su valor para lograr un proceso de DA estable y bien amortiguado.

Sin agentes externos, en un digestor anaerobio los cambios en la alcalinidad pueden ser atribuidos básicamente a dos procesos: *amonificación y reducción de AGV*. Con relación a este último, Janke *et al.* (2016) proponen la estimulación de las arqueas metanogénicas a través de la adición conjunta de urea y micronutrientes como una estrategia alternativa a la adición de agentes “buffer” o tampón (bicarbonato, hidróxido de sodio o hidróxido de calcio) para la estabilización de la DA. Su propuesta se basa en la degradación de urea a amoníaco a través de una reacción bioquímica catalizada por bacterias presentes en el reactor.

Desde principios de la década de 1960 se ha reconocido que el monitoreo de la alcalinidad bicarbonática (AB) o la concentración de AGV (o preferiblemente ambos) es crucial para el control de los reactores anaerobios. Entre los diversos métodos propuestos sobresalen los procedimientos basados en técnicas de titulación, debido a que son métodos baratos, simples y rápidos que tienen como objetivo la determinación de al menos uno de los dos parámetros involucrados (AB y AGV) (Lahav y Morgan, 2004).

Para el monitoreo de la estabilidad biológica de la DA Ripley *et al.* (1986) sugirieron la determinación de un índice denominado AI/AP, el cual se calcula a partir de la titulación de la alcalinidad en dos valores de pH: 5,75 y 4,3; en este índice, AP representa el volumen de ácido gastado hasta pH 5,75 y AI el volumen de ácido requerido para titular entre pH 5,75 y 4,3, los autores encontraron que la DA exitosa o estable ocurre cuando la relación AI/AP es menor a 0,30 y sugieren que valores superiores indican disturbios o estrés en el proceso de DA. Por su parte, Chernicharo (2007) explica que el índice AI/AP corresponde a la relación entre la alcalinidad intermedia (AI), prácticamente equivalente a la alcalinidad de los AGV y la alcalinidad parcial (AP) prácticamente equivalente a la AB. Foresti (1994), citado por (Chernicharo, 2007), advierte que la estabilidad de la DA también depende del tipo de agua residual, por lo que sugiere que el valor de 0,30 debe tomarse como referencia y verificar en cada caso el valor adecuado del índice AI/AP relacionado con la estabilidad.

El concepto de titulación hasta pH 5,75 fue introducido por [Jenkins et al. \(1983\)](#) quienes propusieron incluir este punto de titulación en la determinación de la alcalinidad, ellos afirman que el 80% del bicarbonato se convierte en CO_2 a pH 5,75, mientras que al mismo pH solo alrededor del 20% de los AGV habrán contribuido a la alcalinidad. La metodología propuesta indica que para determinar la AB solo basta afectar el cálculo de la alcalinidad (a pH 5,75) por un factor de 1,25. A partir de la investigación de [Jenkins et al. \(1983\)](#) se formuló el índice α , el cual también ha sido usado para el control de la capacidad tampón y se determina como la relación entre la AB y la alcalinidad total (AT). De acuerdo con [Pérez y Torres \(2008\)](#) durante el arranque de reactores anaerobios se recomiendan que el índice α tome valores superiores a 0,5 y es aceptable valores cercanos a 0,7 en condiciones estables.

El índice tampón o índice *buffer* (IB) que hace referencia a la relación entre AI (alcalinidad debida a los AGV) y AT, también ha sido empleado para el control de la estabilidad de la DA. En general, una variación entre 0,20 y 0,40 es aceptada como indicativo de buen funcionamiento del proceso, lo que indica que por lo menos el 60 % de la AT del sistema tiene que estar en forma de AB ([Rozzi, 1986](#), [Speece, 1996](#), [Pérez y Torres, 2008](#)). También, valores entre 0,20 y 0,30 indican un buen funcionamiento del reactor, mientras que valores menores a 0,20 indican subalimentación y mayores a 0,35, principios de acidificación ([Rojas-Chacón, 2004](#)).

Varios estudios han aplicado los índices de alcalinidad como parámetros de monitoreo en la DA. [Balaguer et al. \(1992\)](#) observaron durante el arranque de un reactor UASB tratando agua residual de una fábrica de almidón de papá, que para mantener su funcionamiento estable la relación AI/AP debe ser menor a 0,4. [Molina et al. \(2009\)](#) usando vino diluido y una solución de dextrina como agua residual, durante la validación de un nuevo sensor para el análisis en línea de AGV y alcalinidad en plantas de tratamiento anaerobio de agua residual, establecieron que la operación segura del digestor anaerobio, es decir sin acumulación de AGV, puede obtenerse manteniendo las relaciones AI/AT y AI/AP por debajo de 0,20 y 0,25, respectivamente. Por su parte, [Ferrer et al. \(2010\)](#) usaron las relaciones AI/AT y AI/AP como indicadores de la concentración de AGV durante la DA de un lodo procedente de un sistema de tratamiento de agua residual. Sus resultados mostraron que la relación AI/AT es menos sensible a la variación de la concentración de AGV que la relación AI/AP y que para prevenir fallas en la DA y mantener una concentración de AGV inferior a $2,5 \text{ g.L}^{-1}$, recomiendan valores de 0,5 y 0,9 para las relaciones AI/AT y AI/AP respectivamente. De modo semejante, [Martín-González et al. \(2013\)](#) aplicando el índice AI/AP identificaron desequilibrios en digestores anaerobios que trataban la fracción orgánica de residuos municipales. Los autores pudieron establecer que con una relación AI/AP inferior a 0,30 es posible mantener la concentración total de AGV entre $2,5$ y $3,5 \text{ g.L}^{-1}$, para lograr un desempeño estable en el digestor con una AT entre 13 y $15 \text{ g CaCO}_3\text{.L}^{-1}$.

Recientemente, [Patón et al. \(2018\)](#) mostraron que las desviaciones incurridas en la determinación de la relación AI/AP pueden alcanzar valores superiores al 20%, considerando la importancia de esta relación en el control de la DA, los autores estiman que omitir esta corrección en los modelos de DA puede causar una subestimación del riesgo de acidificación en el reactor y, conducir a valores de control menos conservadores con mayor riesgo de desestabilización. Debido a la fuerte influencia y relación entre el pH, alcalinidad, AGV y capacidad tampón, [Pérez y Torres \(2008\)](#) evaluaron simultáneamente estos parámetros para aplicar los índices de alcalinidad (IB, índice AI/AP e índice α) en el control del tratamiento anaerobio de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, encontraron que en condiciones estables, el IB varía entre 0,20 y 0,35, el índice AI/AP entre 0,40 y 0,55 y el índice α es superior a 0,65. Adicionalmente, observaron que la eficiencia de reducción de DQO está estrechamente relacionada con la variación de esos índices.

1.2.2 NUTRIENTES

Para la DA, la disponibilidad de nutrientes desempeña un rol importante sobre el crecimiento y actividad del consorcio metanogénico (Cresson *et al.*, 2006). Con relación a esto, Chernicharo (1997b) recomienda para la degradación anaerobia de ácidos grasos volátiles una relación DQO:N:P de 1.000:5:1 y para carbohidratos 350:5:1. En algunos casos, los nutrientes pueden ser aportados por el inóculo y de esta manera evitar la adición de estos elementos, Güngör-Demirci y Demirer (2004) mostraron que a concentraciones bajas de DQO ($< 12.000 \text{ mg.L}^{-1}$ en su estudio) la adición de nutrientes no fue necesaria, ya que su adición no incrementó el desempeño de la DA.

Los micronutrientes, como Fe, Ni, Zn y Co, son conocidos como cofactores bioquímicos necesarios para las arqueas productoras de metano. Janke *et al.* (2016) mostraron que la adición de urea junto con micronutrientes tiene un efecto sinérgico sobre la producción estable de biogás, porque estimula la actividad metanogénica evitando la acumulación de AGV.

1.2.3 TEMPERATURA

De los factores físicos que afectan el crecimiento microbiano, la temperatura es uno de los más importantes en la selección de las especies. Los microorganismos no poseen los medios para controlar su temperatura interna, por lo que la temperatura en el interior de la célula es determinada por la temperatura externa del ambiente (Chernicharo, 2007). Aunque la DA puede tener lugar a temperaturas psicrófilas inferiores a 20°C (Bouallagui *et al.*, 2003) la temperatura óptima para la formación microbiana de metano se encuentra en el rango mesofílico (30 a 35°C) y en el rango termofílico (50 a 55°C).

1.2.4 TIEMPO DE RETENCIÓN HIDRÁULICO (TRH)

El tiempo de retención hidráulico (TRH) es un parámetro operacional importante en la DA, que describe el tiempo promedio teórico de residencia del sustrato dentro del reactor, y el tiempo de contacto entre el sustrato y los microorganismos presentes en el reactor. Por lo tanto, tiene influencia en la eficiencia de la degradación, la producción de biogás y la composición de la comunidad microbiana. En general, se desea un TRH bajo para reducir el volumen del reactor y los costos de inversión (Schmidt *et al.*, 2014).

Para un funcionamiento estable de la DA, se recomienda mantener el TRH en un valor aproximadamente dos veces mayor que el tiempo de generación del crecimiento microbiano más lento, es decir, los metanógenos. Sin embargo, en operaciones de flujo continuo y a largo plazo, el TRH puede cambiar día a día con el cambio en la producción de agua residual. Por lo tanto, su valor óptimo depende principalmente de la tecnología, la composición del residuo y la temperatura. El TRH también determina las velocidades de flujo, por lo que un TRH apropiado puede ser usado para eliminar zonas muertas y lograr un buen contacto entre la biomasa y sustrato (Amani *et al.*, 2010).

La mayoría de los sistemas anaerobios para el tratamiento de agua residual se operan con TRH de varias horas o días. Para reducir el TRH se utiliza la inmovilización de los microorganismos, la cual garantiza altos tiempos de retención celular y puede llevar a bajos TRH como consecuencia del aumento de la concentración de microorganismos. La inmovilización puede ser mediante granulación en reactores UASB y reactores de lodo granular expandido, en ese caso se denomina auto-inmovilización o mediante fijación de una biopelícula sobre un medio de soporte en reactores de crecimiento adherido, ya sea de medio fijo o fluidizado (Chernicharo, 2007).

1.2.5 CARGA ORGÁNICA VOLUMÉTRICA (COV)

En un reactor anaerobio la COV representa la masa de materia orgánica expresada en DQO (sustrato) que se introduce por cada metro cúbico de reactor cada día, también se conoce como tasa de carga orgánica. Cuando se evalúa el desempeño de los reactores anaerobios es común usar la COV como variable de referencia debido a que afecta la ecología microbiana y las características de los reactores provocando un efecto significativo sobre el rendimiento de biogás (Torkian *et al.*, 2003). Amplias y rápidas variaciones de la COV pueden alterar el equilibrio entre la acidogénesis y metanogénesis, altas COV incentivan principalmente la actividad de las bacterias hidrolíticas y acidogénicas, lo que puede provocar una acumulación de AGV e inhibir el metabolismo de los metanógenos y conducir a una falla de la metanogénesis (Zhao *et al.*, 2014).

Matemáticamente, la COV es el resultado de dividir la concentración del sustrato en el afluente (S_o) por el TRH (Ecuación 1.1), se expresa generalmente en $\text{kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$.

$$COV(\text{kg}/\text{m}^3 \text{d}) = \frac{S_o(\text{kg}/\text{m}^3)}{TRH(\text{d})} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

Para la operación de los reactores anaerobios, la COV puede tomar valores en un rango muy amplio, debido a que su elección depende de las características del reactor, del tipo de agua residual, sedimentabilidad y actividad de la biomasa (Schmidt *et al.*, 2014, van Lier *et al.*, 2015). Los factores de interés que controlan la COV son la transferencia de masa, las relaciones sintróficas entre los microorganismos, temperatura, pH y toxicidad (Speece, 1983, Amani *et al.*, 2010).

1.3 REACTOR ANAEROBIO DE CRECIMIENTO ADHERIDO

El interés en el reactor anaerobio de medio adherido surgió con la investigación del filtro anaerobio (FA) realizado por Young y McCarty (1969). La principal característica que define a los reactores anaerobios de este tipo es la presencia de un medio de soporte fijo, el cual permite el desacople entre el tiempo de retención hidráulico (TRH) y el tiempo de retención celular (TRC). De acuerdo con Hickey *et al.* (1991), en el FA la mayor parte de la actividad biológica es debida a la biomasa suspendida o atrapada entre el volumen de poro intersticial del medio de soporte más que a la biomasa adherida. No obstante, la selección del medio de soporte y su efecto sobre el desempeño del FA ha despertado un gran interés debido a que la formación inicial de la biopelícula (biomasa adherida) sobre el medio de soporte en gran medida es responsable del corto período de arranque o puesta en marcha del reactor (Perez *et al.*, 1997).

1.3.1 MEDIO DE SOPORTE O ADHERENCIA

El rol del medio de adherencia es favorecer la adhesión y crecimiento de una biopelícula, es decir biomasa inmovilizada para proporcionar mayor área de superficie de biomasa que puede estar en contacto con el sustrato (agua residual) y de esta manera, mejorar la eficacia del tratamiento en cortos TRH (Chan *et al.*, 2012). Diferentes materiales han sido usados como medio de soporte para la retención de biomasa tales como PVC, espuma de poliuretano, astillas de madera, paja, estopa de coco, fibras de nailon, anillos *etc.*, (Singh y Prerna, 2009), una característica predominante en este tipo de material es que son fáciles de obtener y la más importante, es que son muy baratos.

Los tres factores más usados para caracterizar el medio de soporte son: (i) *rugosidad superficial*, (ii) *porosidad* y (iii) *tamaño del poro*. Picanco *et al.* (2001) indicaron que la porosidad del material tiene una importancia selectiva en la retención de biomasa anaerobia, arqueas metanogénicas parecidas a

Methanosaeta predominan en medios de soporte como ladrillo refractario y cerámica especial, mientras que microorganismos similares a *Methanosarcina* predominan en matrices de PVC y espuma de poliuretano. [Garcia et al. \(2008\)](#) por su parte, exaltan las características del polietileno de baja densidad como un medio de soporte que favorece la adhesión de diferentes microorganismos sobre su superficie, la cual le otorga una ventaja frente a los otros medios de soporte que son más selectivos, además consideran que este material presenta mejor rendimiento en términos de reducción de sólidos y DQO. [Habouzit et al. \(2011\)](#) afirman que las arqueas tienen mejor afinidad por los medios de soporte en PVC que las bacterias, lo cual podría tener un impacto importante sobre el arranque de reactores anaerobios.

Por su parte, [Fox et al. \(1990\)](#) expusieron una teoría en la que señalan que la rugosidad de la superficie es fundamental para el desarrollo de la biopelícula, ya que las grietas que caracterizan a las superficies rugosas permiten la acumulación de la biopelícula, proporcionando un medio de protección y unión en contra de las fuerzas de cizallamiento, evitando así la pérdida de la biopelícula. [Perez et al. \(1997\)](#) utilizando un medio de soporte de vidrio sinterizado de poro abierto y con el apoyo de microscopia de epifluorescencia comprobaron esta teoría, mostrando que la rugosidad de la superficie aumentó tanto la tasa de fijación como la tasa de acumulación de biomasa en el medio de soporte. Lo anterior fue atribuido a que los microorganismos inicialmente colonizados sobre las grietas, estaban protegidos de las fuerzas de corte (cizalla) y de los cambios en las condiciones ambientales, esto permitió concluir que las características de la superficie del medio de soporte aceleraron la formación de la biopelícula.

Con relación a las limitaciones del FA, [Torres et al. \(2003\)](#) exponen que la formación de cortocircuitos ocasionados por la generación de líneas preferenciales de flujo a través del medio de soporte es una de las desventajas de este reactor. También que, de acuerdo con el tipo de medio de soporte, una fracción de volumen del reactor se puede perder debido al volumen de la biomasa retenida. Igualmente, que la alta concentración de sólidos suspendidos en el agua residual puede colmatar rápidamente el medio de soporte, siempre y cuando el porcentaje de espacios vacíos del material sea bajo.

1.4 FACTORES RELACIONADOS CON EL ARRANQUE DE REACTORES ANAEROBIOS

[Heppner et al. \(1992\)](#) definió el período de arranque o puesta en marcha de un reactor anaerobio de medio adherido como "*el tiempo necesario para la selección y disposición espacial de las cepas bacterianas más aptas de un consorcio que este mejor adaptado entre sí y el sustrato*". En general, el principal objetivo del periodo de arranque es desarrollar una biomasa altamente activa con buenas propiedades de sedimentabilidad o adherencia, capaz de soportar una tasa de carga orgánica nominal, con un nivel satisfactorio de remoción de materia orgánica lo más rápido posible ([Escudié et al., 2011](#)). El arranque de los reactores anaerobios es un proceso lento que generalmente requiere periodos superiores a un mes para lograr la adaptación de los microorganismos metanogénicos que se caracterizan por su bajas tasas de crecimiento y baja producción de biomasa con relación al sustrato consumido ([Hassan et al., 2014](#), [Jáuregui-Jáuregui et al., 2014](#), [Cooney et al., 2016](#)). Por lo tanto, el periodo de arranque es a menudo la fase más inestable y difícil de controlar en la DA, y alcanzar su objetivo no es fácil, ya que depende de numerosos parámetros físicos, químicos y biológicos, los cuales fueron adecuadamente resumidos por [Weiland y Rozzi \(1991\)](#) y presentados en la Figura 1.2.

[Lema et al. \(1991\)](#) establecen que, aunque cada tecnología tiene su propia estrategia óptima de arranque, sistema de alimentación, tasa de carga orgánica, homogenización y control de AGV, se deben considerarse los siguientes factores durante el arranque, ya que a menudo esta etapa define la efectividad de la operación del reactor a largo plazo:

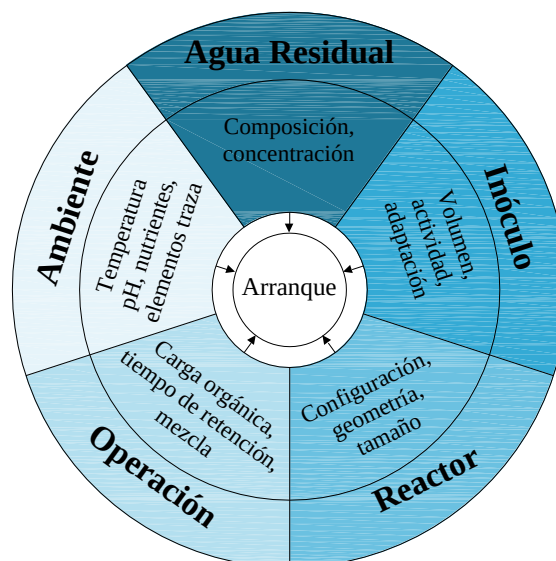


Figura 1.2 Factores que afectan el arranque de reactores anaerobios

Fuente: Weiland y Rozzi (1991)

1.4.1 INOCULACIÓN

En un reactor anaerobio el periodo de arranque inicia después de la inoculación. En la mayoría de los casos, los reactores anaerobios de medio adherido son inoculados en “batch”, con el objetivo de favorecer el crecimiento de la biopelícula a partir del contacto dentro del reactor, entre un inóculo concentrado (bien adaptado) y el medio de soporte. Generalmente, la duración del tiempo de contacto se elige empíricamente y puede variar desde unos días hasta más de un mes (Zwain *et al.*, 2013). Sin embargo, Cresson *et al.* (2006) mostraron que un periodo de contacto de 12 h (en batch) es suficiente para obtener la adhesión de los microorganismos al medio de soporte, debido a que las macromoléculas orgánicas se absorben rápidamente en la superficie sólida, una vez que inicia el contacto entre el sólido y la fase acuosa. Paralelamente, las células plantónicas o de libre flotación se transportan a la superficie del portador de las macromoléculas orgánicas y, se establecen interacciones que conducen a la adhesión microbiana al medio de soporte, para desarrollar de esta manera una biopelícula activa. Las fuerzas de atracción involucradas en este proceso son químicas (fuerzas de van-der-Waals, enlaces de hidrógeno), hidrofóbicas o electrostáticas y ocurren rápidamente después de la inoculación (Mamatarkova *et al.*, 2002).

En general, la tasa de producción de biomasa de las arqueas metanogénicas es del orden de 0,18 kg SV. kg⁻¹ DQO removida. Por lo tanto, la calidad y cantidad del inóculo son dos factores de gran interés para disminuir la duración del periodo de arranque. Una baja cantidad de inóculo retarda el arranque del reactor y un exceso puede ocasionar la expansión del medio de adherencia y lavado del lodo (Pérez *et al.*, 2006). Respecto a la cantidad de microorganismos para la inoculación, las recomendaciones varían entre 10 y 20 kg SSV.m⁻³ (de Zeeuw, 1984). En la práctica es más común inocular el reactor anaerobio con un volumen de lodo que represente entre el 10 y 50 % de su volumen útil (Hickey *et al.*, 1991, Chan *et al.*, 2012, Hassan *et al.*, 2014). Aunque no hay un criterio específico para determinar la cantidad de inóculo, esta tiene un efecto importante sobre la duración del periodo de arranque, una baja cantidad de inóculo retardará el arranque y un exceso podría ocasionar la expansión del lecho y lavado del lodo. También, este periodo será corto si el inóculo tiene una alta actividad metanogénica específica (AME) y está adaptado al sustrato (Pérez *et al.*, 2006).

1.4.2 AUMENTO DE CARGA ORGÁNICA VOLUMÉTRICA (COV)

En los reactores anaerobios, generalmente después de la inoculación le sucede una etapa de arranque progresivo, que consiste en el incremento gradual y continuo de la COV para alcanzar un ecosistema metanogénico estable. La práctica más común para aumentar la COV es aplicar un caudal afluente progresivamente creciente mientras se mantiene una concentración constante de DQO ([Ganesh *et al.*, 2010](#)). Otra alternativa, consiste en mantener un TRH bajo con agua residual diluida al inicio del periodo de arranque y, progresivamente incrementar la concentración de DQO afluente. [Jáuregui-Jáuregui *et al.* \(2014\)](#) propusieron incrementar simultáneamente la concentración de DQO y el TRH, resultando en el incremento progresivo de la COV, esta estrategia permitió el lavado de microorganismos planctónicos (de libre flotación) o biomasa suspendida al inicio de la etapa de arranque y al mismo tiempo, disminuyó el desprendimiento de la biopelícula, facilitando la degradación del sustrato a medida que aumentaba su concentración durante la fase de desarrollo de la biopelícula. [Cresson *et al.* \(2006\)](#) afirman que la estrategia de lavado rápido de las bacterias suspendidas, obtenido a través de un TRH corto, al inicio del arranque es un método eficaz para obtener un arranque rápido, debido a que el sustrato es utilizado muy rápidamente y exclusivamente por los microorganismos adheridos, acelerando el crecimiento de la biopelícula.

En cualquier caso, es importante controlar el aumento de la COV durante el periodo de arranque, para evitar la sobrecarga orgánica del sistema, que podría conducir a una inhibición de los metanógenos y, en consecuencia, a una falla en el proceso de arranque o puesta en marcha ([Escudé *et al.*, 2011](#)). Por lo anterior, la recomendación general para el arranque de los reactores anaerobios es iniciar con una COV bastante baja, pero la selección de este valor depende de la concentración de biomasa y actividad metanogénica específica (AME) del inóculo. En la Tabla 1.3 se presentan algunas referencias relacionadas con la COV y el TRH usados en el arranque de reactores anaerobios de medio adherido. Se observa la amplitud en el rango de variación de estos parámetros.

Tabla 1.3 Diferentes valores de COV y TRH aplicados en el arranque de reactores anaerobios de medio adherido

Tipo de reactor	Sustrato	COV (g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	TRH	Duración del arranque	Autor
Reactor de lecho turbulento inverso	AR reconstituida a base de vino	0,5 a 20	-	86 d	Cresson <i>et al.</i> (2006)
Filtro anaerobio	AR del proceso de extracción de almidón de yuca	-	25 a 12 h	-	Torres <i>et al.</i> (2003)
Filtro anaerobio	AR del proceso de extracción de almidón de yuca	1,1 a 7,6	43 a 9.5 h	60 d	Colin <i>et al.</i> (2007)
Reactor anaerobio de lecho fluidizado	AR de la industria cervecera	0,5 a 10	6,0 h (final)	225 d	Houbbron <i>et al.</i> (2012)
Reactor anaerobio con baffles modificado	AR industria papelera	0,1963	4 d	28 d	Hassan <i>et al.</i> (2014)
Reactor anaerobio de medio fijo	AR de sacrificio de ganado	1,0	7,5 d	15 d	Tritt y Kang (2017)

1.4.3 RENDIMIENTO DE METANO (MY)

Una de las dificultades para monitorear y optimizar el periodo de arranque de los reactores anaerobios de medio adherido, es la falta métodos apropiados para cuantificar la biomasa adherida. El rendimiento de metano (MY) es definido como la cantidad de metano producido por una cantidad de materia orgánica eliminada, este parámetro es el resultado del balance entre los flujos de carbono orgánico hacia el catabolismo y el anabolismo. [Michaud et al. \(2002\)](#) mostraron que el Y_{CH_4} puede ser usado como un parámetro indirecto, para evaluar el periodo de arranque de un reactor anaerobio de medio adherido debido a que en un reactor anaerobio la producción de metano se relaciona con la actividad catabólica y la formación de biopelícula con la actividad anabólica.

[Escudíe et al. \(2011\)](#) indicaron que en el transcurso del periodo de arranque, el MY describe las tres fases de formación de la biopelícula: (i) *iniciación de la biopelícula*, la cual se refleja a través de la disminución de MY, indicando que el carbono orgánico está siendo usado en la actividad anabólica de los microorganismos para construir la biopelícula y, que la biomasa suspendida está siendo “lavada” del reactor (MY muy bajo); (ii) *crecimiento de la biopelícula*, que se expresa a través de un aumento de MY y, (iii) *estado estacionario* en el cual el valor de MY se acerca al valor teórico de $0,35 L_{CH_4} \cdot g^{-1} DQO$, indicando la formación de un ecosistema metanogénico estable. En la Tabla 1.4 se presentan algunos rendimientos de metano observados durante el arranque de reactores anaerobios.

Tabla 1.4 Rendimiento de metano en periodos de arranque de reactores anaerobios

Tipo de reactor	Sustrato	Duración del arranque	MY ($L_{CH_4} \cdot g^{-1} DQO \text{ removida}$)	Autor
Reactor anaerobio de medio adherido	AR industria farmacéutica	30 d	0,25 (58-62% metano)	Gangagni Rao et al. (2005)
Reactor anaeróbico de lecho fluidizado inverso	-	225 d	0,21	Houbron et al. (2012)
Reactor Anaerobio con Baffles modificado	AR industria papelera	30 d	0,10	Zwain et al. (2013)

AR: agua residual

1.5 DIGESTIÓN ANAEROBIA EN DOS FASES

La estabilidad y desempeño de la DA en una fase puede alterarse por el rápido aumento de los AGV y la disminución del pH del medio, inhibiendo posteriormente la fase final (metanogénesis) lo que conlleva a la falla del proceso. Para eliminar este problema operacional, [Pohland y Ghosh \(1971\)](#) formularon un proceso de DA en dos fases, el cual consiste en dos reactores en serie físicamente separados, comúnmente denominados Reactor Acidogénico (RA) y Reactor Metanogénico (RM). El ambiente en el primer reactor es controlado para promover el crecimiento y proliferación de microorganismos formadores de ácidos, mientras que el segundo reactor que recibe el efluente del RA, es diseñado para proveer un ambiente óptimo para los microorganismos productores de metano. La DA en dos fases presenta varias ventajas frente a la DA en una fase:

- (i) La separación física de la acidogénesis y metanogénesis permite la selección y enriquecimiento de diferentes microorganismos, a través del control independiente de las condiciones de operación de cada reactor ([Ince, 1998](#))
- (ii) Optimiza las condiciones para el grupo de bacterias “hidrolíticas-acidogénicas”, así como para el grupo “acetogénicas-metanogénicas”, lo que conlleva a la producción de metabolitos ácidos solubles

más adecuados para los metanógenos, aumentando la velocidad de renovación del sustrato. De esta manera, un sistema de DA en fases separadas permite la reducción del volumen de tratamiento total

(iii) Mediante un control adecuado de la acidificación, el RA puede funcionar como un “buffer” metabólico para neutralizar las sobrecargas y fluctuaciones orgánicas e hidráulicas, debido a que su población bacteriana es más heterogénea. De esta manera, se obtiene mayor estabilidad global del proceso y, el RA puede actuar como una barrera de control de materiales tóxicos para las arqueas metanogénicas, ya que esos materiales pueden ser removidos en el primer reactor, así el RA protege a la población metanogénica que requiere unas condiciones ambientales más controladas para su crecimiento ([Anderson et al., 1994](#))

Las principales limitaciones de la DA en dos fases se relacionan con su alto costo de inversión, mayor esfuerzo en el control operacional y, eventualmente, en el control de pH. Sin embargo, en el tratamiento de residuos estas desventajas pueden ser absorbidas por un arranque más rápido en sistemas de alta tasa, incremento en la estabilidad del proceso, mejora en la eficiencia del proceso, mejor degradación de DQO y SS, incremento en el rendimiento de metano y mejora en la tasa de recuperación de energía ([Weiland y Rozzi, 1991](#), [Schievano et al., 2012](#)). Incrementos hasta del 37% en el rendimiento de metano han sido observados cuando se compara la DA en una y dos fases con iguales TRH ([Massanet-Nicolau et al., 2013](#)).

La DA en dos fases ha sido aplicada con éxito en el tratamiento de residuos sólidos municipales, residuos de cultivos, residuos agroindustriales, residuos de plazas de mercado y residuos de alimentos, ([Talarposhti et al., 2001](#), [Terreros-Mecalco et al., 2009](#), [Rubio-Loza y Noyola, 2010](#), [Guardia Puebla et al., 2014](#)). Para acelerar el proceso, la configuración de los dos reactores obedece a reactores anaerobios de alta velocidad, tales como sistema UASB -UASB, CSTR – FA, reactores híbridos, CSTR – reactor anaerobio de medio fijo o móvil, reactor anaerobio de columna empacada - UASB ([Ke et al., 2005](#), [España-Gamboa et al., 2018](#)).

Recientemente, a partir de un enfoque más holístico, la DA en dos fases es aceptada como una tecnología viable para la coproducción de hidrógeno y metano. En la primera fase, las bacterias acidogénicas convierten los sustratos en H_2 , CO_2 y AGV. Los subproductos gaseosos salen del RA y los AGV ingresan al RM, donde las arqueas metanogénicas los convierten en CH_4 y CO_2 . De esta manera, los principales productos gaseosos del proceso son H_2 , CO_2 y CH_4 . La diferencia fundamental entre la DA en dos fases convencional y la DA en dos fases para coproducción de hidrógeno y metano, es que este último tiene una etapa específica que está orientada para la producción de H_2 , mientras que el primero no. El H_2 gaseoso es más valioso que el CH_4 porque contiene un valor de calentamiento gravimétrico más alto y da como resultado una combustión más limpia ([Fu et al., 2017](#)). La DA en dos fases es investigada como un proceso para la producción de ácidos orgánicos (principalmente ácido acético, propiónico, butírico y valérico) los cuales son fuentes de carbono potencialmente renovables, que tienen una amplia gama de aplicación a nivel industrial como en la producción de bioplásticos, biogás, biodiesel, generación de electricidad, síntesis de biosurfactantes y biofloculantes ([Hasan et al., 2015](#)).

Independientemente de los objetivos de la DA en dos fases, las variables de diseño, control y operación de sus dos reactores (RA y RM) obedecen a las diferencias entre las bacterias acidogénicas y arqueas metanogénicas. Estos microorganismos difieren en sus requerimientos nutricionales, fisiología, requerimientos de pH, cinética de crecimiento, absorción de nutrientes y también, en su capacidad para soportar cambios ambientales ([Anderson et al., 1994](#)).

1.5.1 REACTOR ACIDOGÉNICO (RA)

En un RA suceden simultáneamente las etapas de hidrólisis y acidogénesis. Las reacciones hidrolíticas son catalizadas por reacciones extracelulares que convierten las macromoléculas en compuestos solubles para hacerlos accesibles al interior de la membrana celular de los microorganismos, posteriormente en la etapa acidogénica o fermentación, la materia orgánica disuelta, proveniente de la hidrólisis es degradada a ácidos orgánicos de cadena corta y alcoholes por una población microbiana heterogénea. Las macromoléculas complejas están constituidas por fracciones de proteínas, carbohidratos y lípidos. Así, en un RA las proteínas son primero hidrolizadas y degradadas por enzimas proteolíticas en péptidos y aminoácidos, los cuales son acidificados a ácidos grasos volátiles, hidrógeno, amonio, sulfuro reductor, CO_2 y pequeñas cantidades de H_2 . Por su parte, los carbohidratos son primero hidrolizados por enzimas a azúcares, los cuales son degradados por microorganismos acidogénicos a ácidos grasos volátiles. Adicionalmente, son generados como parte de esta transformación hidrógeno y dióxido de carbono. Cuando los compuestos orgánicos son de tipo soluble, la hidrólisis no tiene lugar y solo ocurre la acidogénesis. Las reacciones de hidrólisis no dan como resultado una oxidación neta o reducción del sustrato (Parra-Huertas, 2015).

La fermentación es la oxidación/reducción internamente equilibrada de compuestos orgánicos, que tiene lugar en ausencia de aceptores de electrones externos (O_2 , NO_3^- , SO_4^{2-} , etc.). En la fermentación, la oxidación de un compuesto orgánico intermedio se acopla a la reducción de otro intermedio orgánico. La fermentación típicamente resulta en la formación de un compuesto de carbono que es más reducido que el donador de electrones orgánico original, y un compuesto de carbono que está más oxidado. Por lo tanto, solo una cantidad parcial de la energía potencial en el compuesto es capturada por el microorganismo, típicamente el 15% de la energía es obtenida en los RA (Schievano *et al.*, 2012).

La morfología del lodo de un RA fue inicialmente examinada por Cohen *et al.* (1979) a partir de la DA en dos fases de un sustrato simple como la glucosa, el lodo acidogénico presentó un color blanco, compuesto por bacterias en forma de bastones (*rod-shaped bacteria*) de longitud variable. Hacen parte del grupo de bacterias acidogénicas, las bacterias hidrolíticas y otras bacterias estrictamente anaerobias tales como *Bacteriodes*, *Clostridium*, *Bifidobacterias* y otros bacilos Gram (+) y Gram (-), además, algunos anaerobios facultativos como *Streptococcus* y bacterias miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Ramón y Maldonado, 2013).

Las principales características que definen al RA son TRH bajo y pH ácido, tienen un tiempo de duplicación mínimo de dos a tres horas, y aunque pueden sobrevivir en un amplio rango de pH entre 4.0 y 8.5, su mayor tasa de crecimiento se encuentra en un pH relativamente ácido, entre 6.0 y 7.0 (Chernicharo, 2007, Ramón y Maldonado, 2013).

Fang y Yu (2000) mostraron que el grado de acidificación del agua residual del procesamiento de lácteos aumenta rápidamente de 28,2% hasta 54,1% con TRH de 4 y 12 h respectivamente, con TRH superiores la acidificación no aumenta significativamente. Así, para ese tipo de agua residual es común usar RA operados con TRH entre 4 y 12 h, y cuando se empleen reactores de medio adherido los TRH pueden ser menores hasta del orden de 2 h (Saddoud y Sayadi, 2007, Hernandez *et al.*, 2018). Durante el arranque de RA, el TRH también es usado como un mecanismo para “lavar” microorganismos de lento crecimiento (Solera *et al.*, 2002, Demirel y Yenigun, 2006).

Cuando la concentración del sustrato es constante, la COV guarda una relación inversa con el TRH. Demirel y Yenigun (2006) reportaron que, en un RA completamente mezclado alimentado con agua residual del procesamiento de lácteos, la tasa de producción de ácidos orgánicos se incrementó proporcionalmente

con la COV cuando el TRH decreció de 24 a 12 h. Los principales ácidos formados fueron ácido acético, propiónico, butírico y valérico.

La temperatura es otra variable de gran interés en la operación de los RA, [Zoetemeyer et al. \(1982\)](#) encontraron una distribución más homogénea de AGV formados cuando los RA son operados en el rango de temperatura mesofílica y, por lo tanto, recomiendan que los RA sean diseñados para trabajar en este rango (por debajo del valor óptimo) como una estrategia de control que contribuya a fomentar la estabilidad del RM, ya que las arqueas metanogénicas son microorganismos incapaces de adaptarse a cambios rápidos de las condiciones. En un hallazgo similar [Cavinato et al. \(2017\)](#) reportaron que en un RA operado con TRH de 4 h y COV de $17,9 \text{ g SV} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ a 37°C los AGV formados estaban compuestos principalmente por ácido acético (44%) y ácido butírico (29%). Sin embargo, la composición de AGV fue más heterogénea a 55°C , conformada por ácido caproico (21%), butírico (19%), pentanoico (10%), heptanoico (10%), propiónico (9%) y acético (9%).

1.5.2 REACTOR METANOGENICO (RM)

Las primeras observaciones al microscopio del lodo de un RM permitieron mostrar que el lodo una coloración oscura (negro) y parecía tener un aspecto granular ([Cohen et al., 1979](#)). Los avances en microbiología permitieron establecer que el lodo metanogénico está compuesto por arqueas anaerobias estrictas y, que en función de los sustratos que utilizan se diferencian en tres grupos: *hidrogenotróficas*, *acetoclásticas* y *metilotróficas*. Estos microorganismos liberan el gas metano como producto final de su metabolismo energético ([Goswami et al., 2016](#)).

Las arqueas *hidrogenotróficas* generan CH_4 a partir del H_2 y CO_2 ; las *arqueas acetoclásticas* llevan a cabo la transformación directa de acetato a un grupo carboxilo que se oxida a CO_2 , y un grupo metilo que da lugar al CH_4 . Una pequeña parte del biogás liberado en un RM se debe a la actividad de un reducido grupo de *arqueas metilotróficas*. En este caso, el metano liberado se debe a la degradación de compuestos metilados, generalmente alcoholes metílicos, metilaminas y metilsulfuros ([Ferrer y Pérez, 2010](#), [Christy et al., 2014](#), [Goswami et al., 2016](#)).

La estabilidad de los RM es muy susceptible a las perturbaciones debido a alta sensibilidad de las arqueas metanogénicas a los factores ambientales. Un cambio abrupto en el pH, aumento en la concentración de sal o materia orgánica, una alteración en la carga orgánica o introducción de un compuesto tóxico son a menudo las principales causas de falla de estos reactores ([Christy et al., 2014](#)). Frente a esta sensibilidad, se ha reportado que las *arqueas acetoclásticas*, en particular, la especie *Methanosarcina sp.* son más resistentes en comparación con otros metanógenos. Esta especie tiene una alta tasa de crecimiento (tiempo de duplicación de entre 1,0 y 1,2 días), es capaz de usar tanto la ruta acetoclástica como la hidrogenotrófica, tolera concentraciones totales de amonio de hasta $7.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, concentraciones de sal hasta $18.000 \text{ mg Na}^+ \cdot \text{L}^{-1}$, cambios de pH entre 0,8 y 1,0 unidades y concentraciones de acetato de hasta $15.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ([De Vrieze et al., 2012](#)).

Los reactores UASB son usados con frecuencia para simular la fase metanogénica (RM) de la DA en dos fases. Las COV aplicadas son variables y dependen del tipo de sustrato. Con agua residual del sacrificio de ganado vacuno se encuentran valores entre 1 y $11 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. Con efluentes del procesamiento de productos lácteos se han reportado valores entre 1 y $31 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. Con efluente de la producción de almidón de yuca se han evaluado cargas entre 5 y $15 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, COV superiores tienen un efecto negativo sobre la tasa de producción específica y rendimiento de metano ([Intanoo et al., 2014](#)). Un resultado similar usando vinazas de caña de azúcar fue reportado por [Fuess et al. \(2017\)](#) al

incrementar la COV en valores superiores a 15 kg DQO.m⁻³.d⁻¹, para este caso el reactor UASB (RM) presentó un desbalance en su desempeño causado por la acumulación de AGV.

De igual forma, la magnitud del TRH aplicado en RM está relacionado con el tipo de sustrato, con sustratos complejos como suero de látex desnatado se han empleado largos TRH del orden de 9 d (Kongjan *et al.*, 2014). A medida que disminuye la complejidad del sustrato, ya sea por su naturaleza o porque se emplean mecanismos para solubilizarlo, también disminuye el TRH en los reactores UASB. Así, adicionando un aditivo (zeolita de óxido de hierro) para solubilizar la paja de arroz durante la fase acidogénica Lu *et al.* (2018) lograron disminuir hasta 48 h (2 d) el TRH en un reactor UASB para la fase metanogénica. Por su parte, Buitrón *et al.* (2014) usando vinazas de tequila con una concentración baja de sustrato (1.636 mg DQO.L⁻¹) obtenida después de la fase acidogénica, lograron un buen desempeño del reactor UASB (RM) operando con TRH de 24 h.

También los reactores de medio adherido han sido aplicados con éxito para la fase metanogénica en DA en dos fases. Fuess *et al.* (2017) usando vinazas de caña de azúcar compararon el desempeño de un reactor UASB con un reactor anaerobio de medio ordenado tratando un efluente acidogénico. Los autores observaron un mejor rendimiento del reactor de crecimiento adherido con COV hasta de 30 kg DQO.m⁻³.d⁻¹ y eficiencia global del sistema en reducción de DQO de 80%.

En la Tabla 1.5 se presentan algunas experiencias relacionadas con el rendimiento y contenido de metano de RM.

Tabla 1.5 Experiencias relacionadas con desempeño de reactores metanogénicos

Configuración del sistema (RA – RM)	Sustrato	Condiciones de operación	MY y contenido de metano	Reducción de DQO (%)	Referencia
Reactor de medio adherido	AR de la extracción de aceite de oliva crudo	COV: 0,19 g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹	0,22 L.L ⁻¹ .d ⁻¹	8	Dalis <i>et al.</i> (1996)
UASB híbrido	AR del procesamiento de café	COV: 2,3 g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹ T: 37°C	0,13 L.g ⁻¹ DQO _{removida} .d ⁻¹ - 67%	90	Guardia Puebla <i>et al.</i> (2014)
UASB	AR del procesamiento de maíz	COV: 1,9 g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹ T: 37°C	282 L.kg ⁻¹ DQO _{removida} – 84%	90	España-Gamboa <i>et al.</i> (2018)

1.5.2.1 Potencial bioquímico de metano (PBM)

El potencial de biometanización o potencial bioquímico de metano (PBM) permite determinar la cantidad de metano generado por masa de sustrato (en términos de sólidos volátiles o DQO alimentados) (Angelidaki *et al.*, 2009). El ensayo de PBM es una metodología útil para determinar la biodegradabilidad última y, el rendimiento de conversión a metano de un sustrato orgánico. Por lo tanto, permite evaluar la viabilidad del proceso anaerobio y proyectar su diseño en función de los parámetros operacionales: producción de metano, tiempo de adaptación del consorcio microbiano y fracción de materia degradable (Alzate *et al.*, 2012). Los rendimientos y parámetros cinéticos del proceso de DA obtenidos a partir del PBM, dependen principalmente de la fuente de inóculo, relación sustrato/ inóculo y temperatura a la cual se lleva a cabo el proceso anaerobio (Moset *et al.*, 2015).

Por lo anterior, un mismo sustrato puede tener diferentes valores de PBM basado en las condiciones de operación del proceso. Los mejores rendimientos de PBM se alcanzan cuando la DA se lleva a cabo a en el rango mesofílico, temperatura adecuada para el crecimiento microbiano de las arqueas metanogénicas. Sin embargo, realizar el proceso a temperaturas superiores a la cual sale el efluente (agua residual) implica costos energéticos que limitan su viabilidad económica (Castro-Molano *et al.*, 2016).

En los ensayos de PBM el periodo de incubación se estima entre 30 y 60 d (Labatut *et al.*, 2011). Para obtener mejores resultados, es recomendado realizar el experimento a temperatura estable, las condiciones de temperatura comúnmente empleadas son entre 30°C y 38°C (De Vrieze *et al.*, 2015). La mezcla continua desempeña un rol importante en el resultado debido a minimiza las limitaciones de la transferencia de masa y ayuda a liberar el gas atrapado en líquido digerido. La mezcla manual una vez por día es suficiente si el sustrato es diluido o fácilmente degradable (Wang *et al.*, 2017a). Aunque las fuentes de inóculo anaerobios son amplias y variadas, la mayoría de experimentos utilizan lodos provenientes de plantas de tratamiento de agua residual (Castro-Molano *et al.*, 2016). Generalmente no se adicionan nutrientes externos debido a que se asume que los nutrientes básicos (N y P) para los microorganismos anaerobios son suministrados por el inóculo (Labatut *et al.*, 2011).

1.6 PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO A TRAVES DE LA FERMENTACIÓN OSCURA

La fermentación oscura es una versión modificada de la DA clásica, donde la fermentación anaerobia se detiene en la tercera etapa y se suprime la etapa de metanogénesis, para no convertir los AGV en CH₄ o para producir H₂ (Singhanian *et al.*, 2012). Cuando el objetivo es la producción de hidrógeno, y debido a que la acidogénesis es la etapa dominante en este proceso, las investigaciones son orientadas al establecimiento de condiciones ambientales, cinéticas, operación y control, más apropiadas para que las bacterias acidogénicas productoras de hidrógeno conduzcan su metabolismo por rutas que conlleven a la producción de este gas.

La fermentación oscura orientada a la producción de hidrógeno es influenciada por diversos factores tales como temperatura, pH, presión parcial de H₂, características y concentración del sustrato, nutrientes (nitrógeno y fósforo) y, iones metálicos (ej. Fe y Ni) (Liu *et al.*, 2006, Infantes *et al.*, 2011). Otros aspectos que definen el desempeño de los reactores anaerobios y por tanto, influyen en la producción de H₂ son la forma del reactor y condiciones de operación, donde resaltan el tiempo de retención hidráulico (TRH), relación sustrato/biomasa, carga orgánica volumétrica y específica (COV y COVe respectivamente), grado de mezcla, fuente del inóculo, forma de inoculación, pretratamiento del inóculo (Wang y Wan, 2009, Fontes y Zaiat, 2012).

1.6.1 TIPO Y PRETRATAMIENTO DEL INÓCULO

El uso de inóculos puros para la producción fermentativa de H₂ resulta poco atractivo, debido a los altos costos en que incurrirían los procesos para esterilizar los diversos sustratos (Baghchehsaraee *et al.*, 2010); por lo tanto, para que la producción biológica de H₂ sea un proceso técnicamente factible se requieren inóculos mixtos, capaces de operar con sustratos no esterilizados. Además, los cultivos mixtos tienen mayor capacidad de adaptación debido a que la diversidad microbiana permite el uso de sustratos heterogéneos (Infantes *et al.*, 2011). Una gran diversidad de fuentes naturales ha sido usada como inóculo para la producción biológica de hidrógeno, entre ellos se destacan lodos municipales, compost y sedimentos de ríos. En algunos casos, el inóculo es directamente usado en el proceso, pero lo más común es aplicar algún tipo de pretratamiento sobre el inóculo, ya que en ellos coexisten bacterias productoras de hidrógeno (BPH)

y bacterias consumidoras de hidrógeno (BCH) y por lo tanto, el H_2 producido puede ser consumido por BCH (Kan, 2012).

Las bacterias acidogénicas del género *Clostridium sp.*, consideradas BPH son capaces de formar esporas bajo condiciones desfavorables mientras que, los microorganismos metanogénicos (consumidores de H_2) no tienen esta capacidad, a partir de estas diferencias se han establecidos diversas estrategias para bloquear a las BCH y seleccionar BPH de alto rendimiento (Castelló *et al.*, 2009, de Sá *et al.*, 2011). Los pretratamientos de inóculos mixtos pueden ser de tipo químico o físico. Del primero hacen parte el pretratamiento ácido, básico, cloroformo, sodio 2-bromoetanosulfonato (BES – BESA por sus siglas en inglés), CO_2 e iodopropano, mientras que la aireación, secado vía infrarrojo y térmico, hacen parte del pretratamiento físico (Valdez y Poggi, 2009, Srikanth *et al.*, 2010, Kannaiah *et al.*, 2013).

Según Li y Fang (2007) los pretratamientos térmico y ácido-básico son los métodos más utilizados para favorecer el predominio BPH en inóculos mixtos. Mohan *et al.* (2008a) evaluaron la influencia de varios tipos de pretratamientos para mejorar la producción de bio- H_2 utilizando agua residual de la agroindustria láctea como sustrato. Los resultados mostraron que todos los pretratamientos (térmico, químico y ácido) tienen una influencia positiva sobre la tasa de producción de H_2 ; sin embargo, para esta investigación el pretratamiento químico presentó la mayor producción de H_2 ($0,0317 \text{ mmol.g}^{-1} \text{ DQO}$). De igual forma, Kan (2012) que evaluó la influencia de varios pretratamientos sobre la producción de H_2 y metabolitos solubles, coincide al afirmar que un inóculo mixto pretratado por cualquiera de los métodos presentados, tiene mayor producción de H_2 que un inóculo mixto sin pretratamiento. No obstante, difiere en la selección del pretratamiento, ya que el autor indica que el pretratamiento térmico (100°C ; 30 min) es más efectivo para enriquecer el inóculo con BPH, presentando una producción de $0,9 \text{ mmol } H_2.\text{mmol}^{-1} \text{ glucosa}$. Este valor es comparable con $0,97 \text{ mmol } H_2.\text{mmol}^{-1} \text{ glucosa}$ reportado por Logan *et al.* (2002) y $1,1 \text{ mmol } H_2.\text{mmol}^{-1} \text{ glucosa}$ reportado por Hu y Chen (2007) en estudios similares.

La efectividad de los diferentes métodos para el pretratamiento de inóculos ha sido ampliamente demostrada, pero es importante resaltar que la mayoría de estos estudios han sido realizados en reactores tipo batch, por lo que se requiere profundizar más en la evaluación de la estabilidad del pretratamiento en condiciones de flujo continuo. Penteado *et al.* (2013), al evaluar la influencia de varios métodos de pretratamiento de inóculo sobre la producción continua de hidrógeno, concluyeron que el pretratamiento ácido del inóculo favorece una producción de hidrógeno más estable en comparación con el tratamiento térmico. De esta manera, se ha identificado el pretratamiento ácido del inóculo como un método ideal para escalar el proceso de producción biológica de hidrógeno, debido a su simplicidad y a su efecto prolongado en condiciones de flujo continuo. En la Tabla 1.6 se ilustran las diversas condiciones empleadas en el pretratamiento térmico y químico de inóculos.

Adicionalmente, para conservar el efecto inicial del pretratamiento, algunos autores recomiendan mantener condiciones de estrés selectivo que eviten el recrecimiento de BCH sin afectar a las BPH. De esta manera, el pH de la fermentación puede ser manejado como un efecto negativo deseable, debido a que bajos valores causan una inhibición sobre las BCH (Grimmler *et al.*, 2011).

1.6.2 pH y AGV

Según Fang y Liu (2002) y Balachandar *et al.* (2013) las tasas de producción y crecimiento de los microorganismos están directamente relacionadas con el pH. Además, el pH interviene en las diferentes rutas metabólicas de transformación de carbohidratos (Khanal, 2003, Masset *et al.*, 2010). Por lo tanto, el pH se constituye en una variable ambiental de gran interés. Se ha establecido que un pH débilmente ácido es un parámetro de operación fundamental para la producción biológica de H_2 , pero aún no se ha delimitado

un rango de operación apropiado (Khanal, 2003, Davila-Vazquez *et al.*, 2008, Infantes *et al.*, 2011, Obazu *et al.*, 2012). La principal causa para que aún no exista un consenso en este tema radica en que, en condiciones de estrés por pH, las bacterias acidogénicas pueden cambiar su metabolismo por uno donde no hay producción de H_2 o inhibir la actividad enzimática (Fang y Liu, 2002, Khanal, 2003, Jung *et al.*, 2011a).

Tabla 1.6 Diversas condiciones del pretratamiento térmico, ácido y alcalino de inóculos mixtos

Inóculo	SV (g.L ⁻¹)	Tipo de pretratamiento	Referencia
Lodo de sistema de lodos activados	3,16 – 4,61	100°C – 30 min	Xiao y Liu (2006)
Lodo de un sedimentador secundario	8,25	121°C – 20 min	Ren <i>et al.</i> (2008)
		pH 3,0 unidades con HCl 1 N durante 24 h	
		pH 11,0 unidades con NaOH 1 N durante 24 h	
Lodo de un digestor anaerobio primario	11,8	100°C – 15 min	Wang y Wan (2008)
		pH 3,0 unidades con HCl 1 mol.L ⁻¹ durante 24 h	
		pH 10,0 unidades con NaOH 1 mol.L ⁻¹ durante 24 h	
Lodo anaerobio deshidratado de un reactor UASB	27,8	100°C – 60 min	Mohan <i>et al.</i> (2008a)
		pH 5,0 unidades con ácido ortofosfórico durante 24 h	
Lodo de un reactor UASB que recibe agua residual de un matadero de aves	36,4	pH 3,0 unidades con HCl 1 N durante 24 h	Penteado <i>et al.</i> (2013)
Lodo de un reactor UASB que trata el agua residual de la cría de ganado porcino	32,5		
Lodo de un digestor anaerobio que recibe agua residual doméstica	10,55	120°C – 30 min	Kim <i>et al.</i> (2013)

En general, se ha establecido que para maximizar el rendimiento de H_2 , las rutas metabólicas deben dirigirse hacia la biosíntesis de AGV como butirato y acetato y, se debe evitar la formación tanto de alcoholes (etanol, butanol) como de ácidos reducidos (lactato), debido a que estos metabolitos contienen átomos de H_2 que no son liberados como gas (Hawkes *et al.*, 2002, Levin *et al.*, 2004). Los estudios relacionados con la fermentación oscura indican que valores de pH entre 4,0 y 4,5 disminuyen la producción de H_2 , porque direccionan las diferentes rutas hacia la producción de lactato, etanol y butanol; en este rango, también se inhibe la actividad de la enzima hidrogenasa, la cual es responsable de catalizar la regeneración del ferredoxin oxidado para producir H_2 (Jung *et al.*, 2011b) es decir, que sin su participación no sería posible una producción teórica de 4 moles H_2 por mol de glucosa (Arias y Rodríguez, 2013).

Grimmler *et al.* (2011) sugieren que las bacterias del género *Clostridium sp* establecen su crecimiento tipo acidogénico a pH 5,8. Fang y Liu (2002) y Wang y Wan (2009) han demostrado que los procesos de fermentación oscura con valores de pH entre 5,0 y 6,0 muestran una mejora en la producción de H_2 , debido a que se obtiene como subproducto principal butirato y acetato; además de en este rango también se inhiben arqueas metanogénicas que son indeseables en la producción de hidrógeno (Maintinguer *et al.*, 2008). Igualmente, se ha establecido que el rango óptimo de pH inicial para la producción de H_2 varía conforme el tipo sustrato orgánico utilizado. Cuando se utiliza sacarosa se emplean valores de pH entre 4,0

y 4,5; almidón entre 4,7 y 5,7, para glucosa es común un valor de 5,5 (Fang y Liu, 2002); xilosa entre 6,0 y 7,0 (Lin y Chang, 2004) y 6,0 para agua residual de industrias de alimentos (Oh y Logan, 2005). Incluso, se ha reportado la producción de hidrógeno en un valor de pH inferior a 3,0 abriendo de nuevo el debate en este campo de la investigación (Mota *et al.*, 2018).

Si bien, las condiciones anteriores se sitúan en lo que se denomina pH ácido, el rango aún es amplio y requiere ser ajustado para cada caso. Considerando estos aspectos, el pH ha sido empleado como una herramienta de control operacional para la producción selectiva de metabolitos solubles (AGV y alcoholes) e H_2 a través de la fermentación oscura (Horiuchi *et al.*, 2002). En la Tabla 1.7 se ilustra la producción de H_2 asociada con diversas condiciones de pH.

Tabla 1.7 Valores de pH usados en la producción fermentativa de H_2

Sustrato	pH (unidades)	Metabolito principal	Rendimiento y/o Producción de H_2	Autor
Glucosa	5,5	-	2,1 mol H_2 . mol ⁻¹ glucosa	Fang y Liu (2002)
Glucosa	6,0	H.But y H. Ac	4.900 mL gas. L ⁻¹ .d ⁻¹ (30% H_2)	Horiuchi <i>et al.</i> (2002)
Sacarosa	4,5	H.But y H. Ac	125 mL H_2 .g ⁻¹ DQO	Khanal <i>et al.</i> (2004)
Glucosa	4,3	Butanol	35 mL. g ⁻¹ glucosa.d ⁻¹	Kim <i>et al.</i> (2004)
Lactosuero	5,0	-	122 mL H_2 .L ⁻¹ .d ⁻¹	Castelló <i>et al.</i> (2009)
Glucosa	5,0	H.But y H. Ac	1,79 mol H_2 . mol ⁻¹ glucosa	Wu <i>et al.</i> (2010)
Agua residual sintética	5,4	-	265 mL H_2 .h ⁻¹	Infantes <i>et al.</i> (2011)
Lactato	6,0 – 7,0	Butirato	154 mmol. L ⁻¹	Grause <i>et al.</i> (2012)
Sacarosa	2,7	Acetato	175 mL H_2 .L ⁻¹ h ⁻¹	Mota <i>et al.</i> (2018)

Por otro lado, la acidogénesis en si misma conlleva a la acumulación de metabolitos ácidos solubles (AGV) causando un fuerte descenso del pH en el sistema e inhibiendo completamente el proceso de producción de H_2 (Srikanth *et al.*, 2009, Grause *et al.*, 2012). Batstone *et al.* (2002) indican que la parte no disociada de los metabolitos solubles puede penetrar la membrana celular de las bacterias y disociarse al interior de las células, alterando el equilibrio fisiológico de las mismas. Para restaurar el equilibrio, las células probablemente utilizarán parte de su energía, reduciendo de este modo, la energía disponible para su crecimiento y afectando por lo tanto, la producción de H_2 . Por otro lado, sí la parte disociada de estos metabolitos solubles está presente en altas concentraciones, el estrés iónico se incrementará, provocando la lisis celular de las bacterias productoras de H_2 (Wang *et al.*, 2008, Castro-Villalobos *et al.*, 2012a).

1.6.3 RELACIÓN SUSTRATO/BIOMASA (Relación S/X)

El cultivo discontinuo de microorganismos (batch) es uno de los métodos más útiles que se ha utilizado con frecuencia, para estudiar los comportamientos cinéticos del crecimiento microbiano y la degradación del sustrato. Con este tipo de ensayos, se ha demostrado que la relación sustrato/biomasa (relación S/X) es el parámetro más impórtate debido a que establece la relación proporcional entre la concentración de sustrato y biomasa; la concentración inicial del sustrato (S_0) representa la fuente de carbono y energía para la biosíntesis y otros fines energéticos, mientras que la concentración inicial de biomasa (X_0) corresponde con la fuente de microorganismos responsables de la utilización del sustrato (Liu, 1996).

De acuerdo con [Chudoba et al. \(1992\)](#), cuando la relación S/X es suficientemente baja, no se produce multiplicación de células durante la eliminación del sustrato. Bajo estas condiciones, el aumento de biomasa se debe principalmente a la síntesis de polímeros de almacenamiento (crecimiento endógeno). A medida que la relación S/X se incrementa se gasta más energía para la multiplicación de células, lo que resulta en mayor oxidación o degradación del sustrato. Sin embargo, esta condición modifica la proporción entre los microorganismos de lento y rápido crecimiento en cultivos mixtos y, por lo tanto, no permite obtener constantes cinéticas representativas del inóculo mixto inicial. Por lo anterior, aunque los cultivos en flujo discontinuo se pueden iniciar con cualquier relación S/X, la distribución de microorganismos del inóculo tiene una fuerte incidencia sobre los resultados y en cualquier caso, una baja diversidad en el inóculo sería deseable para mantener la relación S/X inicial. La relación S/X es expresada por la Ecuación 1.2 presentada por [Nasr et al. \(2011\)](#); en la cual V_t es volumen del sustrato y V_s es el volumen del lodo.

$$\text{Relación S/X} = \frac{V_t(L) \times DQO\left(\frac{g}{L}\right)}{V_s(L) \times S V_{inoculo}\left(\frac{g}{L}\right)} \quad \text{Ecuación 1.2}$$

Aunque la relación S/X tiene influencia tanto en el crecimiento microbiano como en la dinámica de transformación del sustrato, su influencia en la producción fermentativa de hidrógeno ha sido poco estudiada. [Chen et al. \(2006\)](#) evaluaron la cinética de crecimiento de bacterias productoras de hidrógeno utilizando diferentes sustratos, sus resultados mostraron que para carbohidratos puros o sustratos ricos en carbohidratos (ej. sacarosa) el rendimiento máximo de hidrógeno (234 mL.g⁻¹ DQO) y la tasa máxima de producción específica de hidrógeno se logra con una relación S/X de 7,3 g DQO.g⁻¹ SSV, con valores superiores decrecen los rendimientos. Para sustratos complejos, el incremento en la relación S/X incrementa lentamente la tasa de producción específica de hidrógeno, pero tiene un efecto contrario sobre el rendimiento de hidrógeno. Así, a partir de leche sin grasa y residuos de alimentos los rendimientos máximos de hidrógeno fueron 119 mL.g⁻¹ DQO con una relación S/X de 14,7 g DQO.g⁻¹ SSV y 101 mL.g⁻¹ DQO con una relación S/X de 7,8 g DQO.g⁻¹ SSV respectivamente. Mientras que la tasa máxima de producción específica de hidrógeno, para los mismos sustratos fue obtenida con una relación S/X de 125 g DQO.g⁻¹ SSV y 55 g DQO.g⁻¹ SSV, respectivamente. Además, concluyen que la producción potencial y la tasa de producción de hidrógeno, también se incrementan con el incremento en la concentración del sustrato.

Por su parte, [Yang et al. \(2007\)](#) obtuvieron el altos rendimientos de hidrógeno a partir de la fermentación oscura de agua residual de la industria láctea con una relación S/X de 1,0 y 1,5 g DQO.g⁻¹ SSV), menores a las previamente reportadas. También [Nasr et al. \(2011\)](#) estudiando la fermentación oscura de la vinaza (recolectada en una planta productora de etanol) para la producción biológica de hidrógeno, determinaron el rendimiento máximo de hidrógeno con una relación S/X entre 1 y 2 g DQO.g⁻¹ SSV. Con bagazo de caña de azúcar hidrolizado como sustrato potencial para la producción fermentativa de hidrógeno, [Reddy et al. \(2017\)](#) reportaron que el máximo rendimiento de hidrógeno de 0,84 mol. mol⁻¹ de glucosa fue obtenido con una relación S/X de 0,5 g DQO.g⁻¹ SSV en combinación con un pH de 5,0.

A pesar de que los reportes anteriores sugieren que a menores valores de la relación S/X mayor es el rendimiento de hidrógeno, existen estudios donde se indica lo contrario. [Lucas et al. \(2015\)](#) atribuyen los bajos rendimientos de hidrógeno observados a partir de agua residual del procesamiento de extracción de almidón de yuca, lácteos y cítricos, a la baja relación S/X (0,79 g DQO.g⁻¹ SSV) empleada en su investigación, y concuerdan con [Chen et al. \(2006\)](#) al expresar que valores mayores de la relación S/X son favorables para la fermentación oscura.

En la producción biológica de hidrógeno la relación S/X es un factor que ha sido investigado para obtener inóculos enriquecidos con BPH. Sin embargo, los resultados no son consistentes debido a que tanto altas como bajas relaciones de S/X optimizan el rendimiento de hidrógeno en diferentes circunstancias. No

obstante, los estudios convergen al demostrar que la relación S/X influye en el rendimiento de hidrógeno y que probablemente, para cada sustrato hay un rango en el cual la relación S/X optimiza el rendimiento de hidrógeno (Chen *et al.*, 2006, Lucas *et al.*, 2015).

1.6.4 CARGA ORGÁNICA VOLUMÉTRICA ESPECÍFICA (COVe)

En sistemas en flujo continuo, la relación S/X adquiere otra dimensión y pasa a denominarse carga orgánica volumétrica específica (COVe). Este concepto es similar a la relación alimento/microorganismo que se emplea en los sistemas de lodos activados que relaciona la masa de sustrato aplicada diariamente con la masa de microorganismos presente en el sistema, por lo que su valor se encuentra relacionado con la tasa de utilización de sustrato (Rittman y McCarty, 2001). En los sistemas de flujo continuo la COVe puede tener una influencia directa sobre la eficiencia de transformación del sustrato (Anzola Rojas, 2014).

Anzola-Rojas *et al.* (2015) sostienen que la disminución continua de la COVe causada por la acumulación sistemática de biomasa, afecta la generación de biogás y que, una COVe de 6,0 g sacarosa.g⁻¹ SV.d⁻¹ es necesaria para mantener la estabilidad en el sistema. Por su parte, Hafez *et al.* (2010b) sostienen que a mayor producción de biomasa menor es el rendimiento de hidrógeno, esta relación (inversa – negativa) complica el diseño de los reactores productores de hidrógeno y sugieren una COVe entre 4,4 a 6,4 g DQO.g⁻¹ SV.d⁻¹, para mantener un balance adecuado entre estos parámetros. Ramírez-Morales *et al.* (2015) confirman que tanto la producción de biomasa como el rendimiento de hidrógeno son funciones de la COVe, nombrada en su estudio como relación F/M. Además, afirman que el coeficiente de producción de biomasa no es constante y depende de la COVe, incluso para valores altos que oscilan entre 20 y 80 g DQO.g⁻¹ SV.d⁻¹.

Considerando las dificultades para controlar el crecimiento de biomasa en los reactores de medio adherido y mantener la COVe en un rango adecuado, Gomes *et al.* (2015b) evaluaron un reactor de tubos múltiples como estrategia para controlar la COVe durante la producción de hidrógeno vía fermentación oscura, la ventaja de esta configuración frente a los reactores de medio adherido convencionales, es que proporciona una descarga continua de biomasa evitando la acumulación de sólidos a largo plazo. Aunque sus resultados no fueron totalmente satisfactorios en el control de la COVe debido a que el sistema perdió continuamente biomasa, y solo una fracción fue retenida en el sistema (entre 11 y 23 %) impidiendo una COVe constante en el reactor, en el estudio fueron obtenidos picos de producción de hidrógeno con COVe superiores a 10 g sacarosa. g⁻¹ SV.d⁻¹, lo cual resulta interesante porque esos valores pueden generar condiciones desfavorables para la producción de hidrógeno, debido a que se puede presentar insuficiencia de biomasa para asimilar las COV aplicadas.

La adición de calcio ha sido estudiada como una estrategia para inducir mecanismos de biofloculación y de esta forma, facilitar la agregación microbiana dentro de reactores acidogénicos (Huang y Pinder, 1995, Sobeck y Higgins, 2002, Yuan *et al.*, 2010). Recientemente, Blanco *et al.* (2017) mostraron que la dosificación de calcio es una estrategia efectiva para mejorar la retención de biomasa dentro de un reactor anaerobio de medio ordenado, con una relación DQO/Calcio de 1.357 y manteniendo una COVe en un rango entre 4,2 y 6,9 g DQO. g⁻¹ SV.d⁻¹, alcanzaron un alto rendimiento y producción de hidrógeno (4,4 mol H₂. mol⁻¹sacarosa y 124 mL H₂.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente).

1.7 REACTORES ANAEROBIOS DE BIOMASA SUSPENDIDA

Los reactores de crecimiento suspendido comúnmente denominados reactores de mezcla completa o CSTR (por sus siglas en inglés) han sido empleados con éxito en la producción biológica de hidrógeno. Estos reactores a diferencia de los de crecimiento adherido, permiten un mejor control del crecimiento y

acumulación de biomasa, lo que se constituye en una ventaja importante para el control de la COVe, variable relevante en la producción de hidrógeno por la vía fermentativa. En este tipo de reactores, las BPH se suspenden en una condición favorable de mezcla, permitiendo una menor resistencia a la transferencia de masa. Sin embargo, en estos reactores el TRH es igual tiempo de retención celular por lo que con TRH muy bajos se pierde biomasa por un efecto de lavado (Ren *et al.*, 2010), lo que conlleva a una modificación constante de la COVe. Por lo que el TRH es una variable de interés cuando se utilizan reactores de crecimiento suspendido en la producción biológica de hidrógeno.

Gavala *et al.* (2006) compararon el desempeño entre un CSTR y un reactor UASB para la producción fermentativa de hidrógeno y, encontraron que la eficiencia en el consumo de glucosa disminuye con la disminución del TRH (12 a 2 h). Para el CSTR con TRH de 2 h, el reactor se aproxima al punto de lavado y sólo obtiene una eficiencia en transformación de materia orgánica de 23%. En condiciones termofílicas (55°C) el CSTR con TRH de 6 h presentó una mayor tasa de producción específica de hidrógeno ($104 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) y baja producción de biomasa comparada con la obtenida bajo condiciones mesofílicas ($12 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ SSV a 35°C). Con relación al reactor UASB, los autores observaron que con TRH de 2 h la tasa de producción de hidrógeno fue significativamente mayor en comparación con la obtenida en el CSTR (19,05 y $8,42 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ respectivamente) mientras que el rendimiento de hidrógeno ($\text{mmol H}_2 \cdot \text{mmol}^{-1}$ glucosa consumida) fue superior en el CSTR (0,7 y $1,7 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{mmol}^{-1}$ glucosa consumida respectivamente).

El TRH en un CSTR no solo es importante para evitar el lavado de la biomasa, Arooj *et al.* (2008) mostraron que con el control del TRH, también se direccionan las rutas metabólicas hacia una mayor producción de hidrógeno. Con TRH de 12 h y relación butirato/acetato de 4,3 el máximo rendimiento observado fue $0,92 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ de glucosa; TRH menores (9, 6 y 4 h) incentivaron el decrecimiento en la concentración de butirato y disminución en la producción de hidrógeno. El lavado de biomasa fue observado con TRH entre 4 y 3 h.

Debido a que el rendimiento molar de hidrógeno ($\text{mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ de sustrato consumido) esta termodinámicamente limitado por las condiciones de los microorganismos, Davila-Vazquez *et al.* (2009) advierten que es importante estudiar la tasa de producción volumétrica de hidrógeno para determinar la viabilidad de la aplicación a gran escala de los procesos de fermentación oscura, porque cuanto mayor sea la concentración de sustrato o COV, menor será el tamaño del reactor y, por lo tanto, menor su costo. En su investigación con un CSTR operado con TRH de 6 h, agua residual de la producción de queso (lactosuero) y COV de $138,6 \text{ g de lactosa} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ obtuvieron una producción volumétrica máxima de hidrógeno de $46,61 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ y un rendimiento molar de $2,8 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ lactosa. Los principales metabolitos solubles fueron ácido butírico, propiónico y acético con una relación butirato/acetato entre 1 y 2.

Por su parte, Ren *et al.* (2010) observaron que introducir carbón activado granular en un CSTR para incentivar el crecimiento adherido, mejoró su desempeño en comparación con un CSTR de crecimiento suspendido tradicional, logrando una mayor tasa de producción de hidrógeno (9,72 y $6,65 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ respectivamente). En esa investigación, el sistema con medio adherido operado con una COV de $40 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ produjo una cantidad significativa de metabolitos solubles (AGV) y productos gaseosos (H_2 y CO_2) los cuales disminuyeron sensiblemente cuando la COV se redujo a $24 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, mostrando el efecto de la COV (por incremento en la concentración del sustrato) sobre la transferencia de masa. Mientras que en el CSTR tradicional el aumento de la COV causó una inhibición sobre la producción de AGV, H_2 y CO_2 . Aunque la concentración de biomasa en el reactor de medio adherido fue mayor ($15,5 \text{ g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$) que en el de medio suspendido ($6,48 \text{ g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$), la máxima tasa de producción específica fue obtenida en este último reactor ($5,13 \text{ L H}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ SSV} \cdot \text{d}^{-1}$).

Gavala *et al.* (2006) y Ren *et al.* (2010) quienes reportaron comportamientos similares sugieren que para seleccionar entre un sistema de crecimiento auto inmovilizado o adherido y suspendido (CSTR) se busca un equilibrio entre la eficiencia técnica que está relacionada con el rendimiento de hidrógeno ($\text{mol de H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ de sustrato consumido) y la eficiencia económica que está relacionada con el tamaño o volumen de los reactores y en este caso, basada en la tasa de producción de hidrógeno ($\text{mol H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), debido a que sus investigaciones mostraron mayores tasas de producción de hidrógeno con sistemas de crecimiento auto inmovilizado o adherido, pero mayores rendimientos de hidrógeno con reactores de crecimiento suspendido.

1.8 ACOUPLE DE REACTORES ANAEROBIOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO Y BIOMETANO

La búsqueda en bases de datos mezclando palabras claves como “*methane, hydrogen, anaerobic digestion, dark fermentation, two-phases*”, permite mostrar el creciente interés que ha despertado la producción conjunta de H_2 y CH_4 en los últimos 25 años (Figura 1.3). Algunos de los avances relacionados con la producción de H_2 y CH_4 a través de la DA en dos fases se citan a continuación.

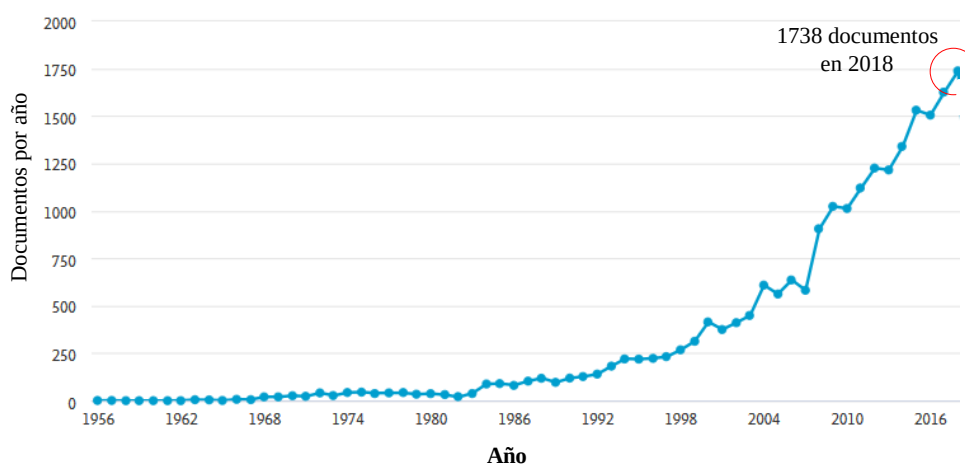


Figura 1.3 Cantidad de artículos científicos relacionados con la producción de H_2 y/o CH_4 involucrando la digestión anaerobia en una y dos fases

Búsqueda realizada a través de Scopus con 22087 documentos. A la fecha, en el año 2019 se han publicado 626 documentos

Cooney *et al.* (2007) simularon a escala de laboratorio un proceso de digestión anaerobia de fases separadas a través de dos reactores anaerobios completamente mezclados, inoculados con lodo proveniente de un digestor anaerobio sin ningún pre-tratamiento; emplearon glucosa como sustrato y controlaron el pH de cada reactor a 5.5 unidades en el primero y 7.0 unidades en el segundo, con la adición de hidróxido de sodio. Entre los resultados más importantes, se resalta la necesidad de utilizar algún tipo de pre-tratamiento para evitar el ingreso en el primer reactor, de microorganismos no productores de hidrógeno, en este caso, bacterias productoras de ácido láctico. Aunque el ácido láctico fue eficientemente transformado en el reactor metanogénico, su generación en el primer reactor tuvo gran incidencia en la baja producción de H_2 .

Kyazze *et al.* (2007) evaluaron la producción continua de H_2 y CH_4 como una función de la concentración del sustrato, emplearon sacarosa y un sistema en dos fases compuesto por un reactor anaerobio completamente mezclado para la fase hidrogénica y un filtro anaerobio de flujo ascendente para la fase metanogénica. La degradación de la DQO en el reactor metanogénico disminuyó cuando se aplicó una COV de $13,0 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ equivalentes a una concentración de $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarosa. En su estudio,

los investigadores encontraron que el sodio a concentraciones superiores a $1,87 \text{ g.L}^{-1}$ inhibe la producción de metano y los efectos tóxicos se producen a una concentración de sodio de $2,75 \text{ g.L}^{-1}$.

Mohan *et al.* (2008b) emplearon un reactor acidogénico de crecimiento adherido operado como un reactor secuencial de flujo discontinuo (15 min de llenado, 23 h de reacción, 30 min de sedimentación y 15 min de vaciado) alimentado con agua residual sintética con una COV de $4,75 \text{ kg DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$, inoculado con un lodo anaerobio mixto selectivamente enriquecido con microorganismos acidogénicos y pH de operación de 6,0. El efluente de este reactor fue usado para alimentar un reactor metanogénico también operado como un reactor secuencial de flujo discontinuo a pH de 7,0 y evaluado a COV entre 0,975 y $2,08 \text{ kg DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$. Luego de 60 d de operación y bajo condiciones estables, el reactor acidogénico mostró una producción de H_2 de $16,91 \text{ mmol.d}^{-1}$ y una eficiencia de reducción de DQO de 36,56%, mientras que el reactor metanogénico redujo la DQO afluente con una eficiencia del 54,44% y sólo produjo CH_4 .

Venetsaneas *et al.* (2009) evaluaron la producción de H_2 y CH_4 a partir de agua residual de la industria láctea. Para las dos fases (hidrogénica y metanogénica) se utilizaron reactores anaerobios completamente mezclados, con TRH de 24 h y 20 d respectivamente. Los reactores no estaban interconectados; el efluente de la fase hidrogénica se preservó a 20°C hasta que se inició la evaluación del reactor metanogénico. El pH en el primer reactor fue 5,2 y la tasa de producción de H_2 fue $2,9 \pm 0,2 \text{ L H}_2.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ y el rendimiento de H_2 fue $0,78 \pm 0,05 \text{ mol H}_2.\text{mol}^{-1}$ glucosa consumida. Por su parte, el reactor metanogénico produjo $1 \text{ L CH}_4.\text{d}^{-1}$ lo cual correspondió a $6,7 \text{ L}$ de CH_4 por L de agua residual afluente, con una de reducción de DQO del 95,3%.

Hafez *et al.* (2010a) evaluaron un sistema a escala de laboratorio a 37°C durante 45 días alimentado con un lixiviado sintético. El sistema estaba compuesto por dos reactores completamente mezclados, separados por un sedimentador secundario y un tanque de almacenamiento. El primer reactor se empleó para la producción de H_2 con un volumen de $5,0 \text{ L}$ y el segundo para la producción de metano con un volumen de 10 L . El pH de operación para el primer reactor fue entre 5,5 y 6,5 unidades, y para el segundo $7,0$ unidades. El TRH fue de 8 h y 10 d respectivamente y COV de $22,5$ y $0,6 \text{ g DQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ en el mismo orden. Con estas condiciones operacionales los autores reportan una producción de H_2 de $2,8 \text{ mol H}_2.\text{mol}^{-1}$ glucosa, $368 \pm 58 \text{ mL CH}_4.\text{g}^{-1} \text{ DQO}$ y una eficiencia total en reducción de DQO de 94%. Los resultados son atribuidos al desacople entre el tiempo de retención celular (TRC) y TRH, ya que con el sedimentador secundario el TRC en el primer reactor fue de 2,2 d.

Peixoto *et al.* (2012) evaluaron el potencial de cuatro efluentes (agua residual doméstica, glicerol, agua residual de arroz precocido y vinaza) para la generación secuencial de H_2 y CH_4 . Emplearon reactores tipo batch a escala de laboratorio con volumen útil de $1,0 \text{ L}$. La fase acidogénica fue evaluada durante 42 h con un pH de 5,5 unidades y, la fase metanogénica con duración de 176 h, el pH fue ajustado a 7,0 unidades. Al finalizar la fase acidogénica se desmontaron los reactores y el sobrenadante filtrado junto con biomasa metanogénica, fueron nuevamente introducidos en el reactor para iniciar la evaluación de la fase metanogénica. Los resultados mostraron que la vinaza exhibió el potencial más alto, junto con la más alta recuperación de energía ($10,4 \text{ kJ.g}^{-1} \text{ DQO}$) y reducción de materia orgánica (74,7%). En la etapa acidogénica, la vinaza presentó una tasa de producción de H_2 de $0,84 \text{ mL.h}^{-1}$ y tasa específica de producción de H_2 de $2,95 \text{ mL.g}^{-1} \text{ SSV.h}^{-1}$. Mientras que la fase metanogénica produjo $255,44 \text{ mL CH}_4.\text{g}^{-1} \text{ DQO}$.

Dareioti y Kornaros (2014) estudiaron el efecto del TRH sobre la co-digestión de una mezcla de residuos agroindustriales (agua residual del lavado de aceitunas, suero de queso y estiércol líquido de vaca) aplicando DA en dos fases utilizando dos reactores anaerobios completamente mezclados. La mayor tasa de producción de hidrógeno ($1,72 \text{ L H}_2.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) y el mayor rendimiento de hidrógeno ($0,54 \text{ mol H}_2.\text{mol}^{-1}$ de carbohidratos consumidos) fueron obtenidos cuando el RA fue operado con TRH de 18 h; con TRH mayores

se presentaron en el RA mayores cantidades de AGV acompañadas de menor productividad de hidrógeno. El RM fue operado a un pH no controlado de 7,8 y TRH de 20 y 25 d; el mejor desempeño fue observado con TRH de 25 d alcanzando una tasa de producción de metano de $0,33 \text{ L CH}_4 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. El TRH de 20 provocó una acumulación de AGV e inestabilidad en el reactor.

Nualsri *et al.* (2016) acoplaron un reactor de mezcla completa (CSTR por sus siglas en inglés) con un reactor UASB para la producción de hidrógeno y metano en dos etapas. Con un TRH de 3 h en el CSTR y 3 d en el UASB lograron una tasa máxima de producción de hidrógeno de $17,5 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ y, una tasa de producción de metano de $2,25 \text{ L CH}_4 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ dando como resultado una tasa de producción de energía total de $270 \text{ kJ} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Los reactores respondieron bien para la producción de hidrógeno y metano durante 200 días, con una reducción total de DQO de 97,5%. Con relación a la comunidad microbiana, los autores observaron que el jarabe de caña de azúcar contiene una microflora natural que, aunque no inhibe la producción de hidrógeno sí compite por el sustrato sin producir hidrógeno. Esa microflora natural compuesta por *Hydrogenimonas sp.*, *Tetrasphaera sp.*, *Flammeovirga sp.*, *Tissierella sp.*, *Butyrivibrio sp.*, y *Desulfobulbus sp.* estaba presente principalmente en el RA y se vio muy afectada por la disminución del TRH de 12 h a 2 h, por el contrario, el *Clostridium sp.*, (productores de hidrógeno) que fue la especie dominante en el RA y la comunidad de arqueas en el RM no fueron afectados por la disminución del TRH. Aunque el RM fue alimentado directamente con el efluente del RA sin ningún acondicionamiento, la relación de AGV y alcalinidad en el reactor UASB (RM) siempre estuvo por debajo del valor crítico (0,4) en cada TRH, indicando la estabilidad del proceso de producción de metano a largo plazo aún con la alimentación directa del RA.

Reungsang *et al.* (2016) demostraron que la DA en dos fases es un proceso confiable y eficiente tanto para la recuperación de energía, a través de la producción de hidrógeno y metano, como para la reducción de la carga de DQO del agua residual, en este caso emplearon jugo de la caña de azúcar. En su investigación establecieron que el máximo rendimiento de metano ($305,43 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{ SV}_{\text{sustrato adicionado}}$) fue obtenido con una relación de S/X de 0,83 $\text{g SV}_{\text{sustrato}} \cdot \text{g}^{-1} \text{ SV}_{\text{inóculo}}$ y TRH de 4 d. Además, demostraron que la relación S/X es una variable importante durante la DA de sustratos con alto contenido de sólidos, que afecta la producción enzimática en el proceso debido a que valores altos de esta relación (baja concentración de inóculo) pueden ser tóxicos para los microorganismos que secretan enzimas, mientras que relaciones muy bajas pueden inhibir la función de las enzimas. Reportaron una producción total de energía de $219,23 \text{ kJ} \cdot \text{L}^{-1}$ ($8,77 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}$) y una eficiencia de eliminación de DQO de 75,6%.

Evaluando aspectos técnicos, económicos y ambientales de la DA y, formulando diferentes escenarios para la implementación de plantas de biodigestión para el tratamiento de vinaza en biorrefinerías de caña de azúcar de primera generación, Fuess *et al.* (2018) establecieron que la DA en dos fases mejora la generación de energía eléctrica (20 – 30%) en comparación con la DA en una fase. Sin embargo, advierten que la optimización de la alcalinización de la fase metanogénica es un factor preponderante para mejorar el rendimiento económico y ambiental de las plantas de biodigestión, para lo cual recomiendan el uso de dosis bajas de hidróxido de sodio (4 g de NaOH. $\text{kg}^{-1} \text{ DQO}$).

Tabla 1.8 Antecedentes relacionados con el acople de reactores anaerobios para la producción de biohidrógeno y biometano

Sustrato	Tipo de reactor		Condiciones de operación		Producción de hidrógeno	Producción de metano	Autor
	RA	RM	Fase Acidogénica	Fase Metanogénica			
Efluente acidogénico (vinaza de caña de azúcar)	-	AnSBBR	-	COV: 6,6 kg DQO.m ⁻³ .d ⁻¹ Relación NaHCO ₃ /DQO: 1:2 pH : 7,0	-	133,1 mol CH ₄ .m ⁻³ .d ⁻¹	Volpini <i>et al.</i> (2018)
Agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca	UASB		T: 37 °C	T: 37 °C	HY: 39,83 L H ₂ .kg ⁻¹ DQO removida	TPe: 0,91 L CH ₄ . L ⁻¹ .d ⁻¹	Intanoo <i>et al.</i> (2016)
			pH: 5,5			MY: 115,23 L CH ₄ .kg ⁻¹ DQO removida	
			COV: 25 kg.m ⁻³ .d ⁻¹		TPe: 0,39 L H ₂ . L ⁻¹ .d ⁻¹		
			Inóculo pretreatado: 95°C, 15 min Relación DQO:N: 100:1	COV: 8,0 kg DQO.m ⁻³ .d ⁻¹	%H ₂ : 36,4%	Reducción de DQO: 93,2%	
Vinaza de caña de azúcar	Reactor anaerobio de medio fluidizado		T: 55 °C	T: 55 °C	%H ₂ : 23,9%	%CH ₄ : 74,5%	Ramos y Silva (2019)
			Inóculo pretreatado: 90°C, 10 min	TRH: 10 h	TPe: 1,30 L H ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹	MY: 0,263 L CH ₄ .kg ⁻¹ DQO removida	
			TRH: 4 h	COV: 21,6 kg DQO.m ⁻³ .d ⁻¹ Alcalinizante: 0,5 - 0,7 g NaHCO ₃ / g DQO	HY: 0,34 mmol H ₂ .g DQO ⁻¹	Reducción de DQO: 70,1%	
Efluente acidogénico (vinaza de caña de azúcar)	- UASB			T: 30 °C		MY: 305,43 mL CH ₄ .g ⁻¹ SV adicionados	Reungsang <i>et al.</i> (2016)
				TRH: 4 d			
				COV: 3,41 kg DQO.m ⁻³ .d ⁻¹		Reducción de DQO: 75,6%	
				Relación S/X: 0,83 g SV sustrato/g SV inóculo			
Jarabe de caña de azúcar	CSTR	UASB	TRH: 3 h	TRH: 3 d	TPe: 17,5 L H ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹	TPe: 2,25 L CH ₄ . L ⁻¹ .d ⁻¹ Reducción de DQO: 97,5%	Nualsri <i>et al.</i> (2016)
Mezcla de residuos agroindustriales (agua residual del lavado de aceitunas, suero de queso y estiércol líquido de vaca)	CSTR		TRH: 18 h	pH: 7,8 TRH: 25 d	TPe: 1,72 L H ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹	TPe: 0,33 L CH ₄ . L ⁻¹ .d ⁻¹	Dareioti y Komaros (2014)
			TRH: 24 h pH: 5,2	TRH: 20 d	TPe: 2,9 ± 0,2 L H ₂ . L ⁻¹ .d ⁻¹ HY: 0,78 ± 0,05 mol H ₂ . mol ⁻¹ glucosa consumida	Reducción de DQO: 95,3%	Venetsaneas <i>et al.</i> (2009)

1.9 PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA, AGUA RESIDUAL Y TRATAMIENTO ANAEROBIO

La yuca que es un tubérculo muy rico en carbohidratos en forma de almidón, recibe diferentes nombres comunes: yuca en el norte de América del Sur, América Central y las Antillas, mandioca en Argentina, parte de Brasil y Paraguay, “cassava” en países anglo parlantes, guacamote en México, aipim y macacheira en algunas regiones de Brasil y mhogo en swahili en los países de África oriental ([Aristizábal et al., 2007](#)). Esencialmente, el almidón de yuca se compone de dos polímeros que solo difieren en su estructura: amilosa (16 al 30%) y amilopectina (65 al 85%) ([Vendruscolo, 2015](#)). Debido a su composición (96% de carbohidratos, 3% de proteínas y 12% de humedad) el valor nutricional del almidón de yuca es altamente energético, es una fuente de carbohidratos con bajo contenido de proteína y grasa, por lo que se puede usar para mejorar el contenido energético de ciertos alimentos, sin suministrar grasa extra, también puede ser un ingrediente funcional en la elaboración de alimentos ([Vargas-Aguilar y Hernández-Villalobos, 2013](#)).

En Colombia, Brasil e India el almidón natural (llamado también almidón nativo, dulce o industrial) se usa solo o mezclado como ingrediente para la elaboración de harinas, macarrones, pan, pudines, galletas, caramelos, bizcochos, almojábanas, cremas, helados, ensaladas, embutidos, agentes espesantes, bebidas fermentadas y jarabe de glucosa. En Colombia, con el almidón fermentado (agrio) se elaboran productos alimenticios tradicionales como el pandebono y el pan de yuca ([Alarcón Morante et al., 1998](#)). También se ha empleado en alimentos procesados como salsas, sopas, rellenos de fruta, productos a base de crema y productos congelados. En India, el almidón de yuca se utiliza para elaborar bebidas energéticas ([Pizarro et al., 2016](#)). En otras aplicaciones no relacionadas con la industria alimenticia, el almidón de yuca es usado en la preparación de cartón, papel, adhesivos y encolados. También, es usado en la industria textil, química y farmacéutica ([Alarcón Morante et al., 1998](#), [Breuninger et al., 2009](#)).

A diferencia de los almidones de cereales que requieren procesos industriales muy tecnificados, los almidones de raíces y tubérculos (incluida la yuca) son más fáciles de obtener debido a que contienen bajos niveles de proteínas y grasas; para su obtención sólo se requiere molienda, tamizado, separación con agua, sedimentación y secado ([Alarcón Morante et al., 1998](#), [Pizarro et al., 2016](#)). Los principios de extracción de almidón de yuca se aplican en todas las tecnologías y solo varían dependiendo de las tecnologías, el proceso consiste en una serie de operaciones que, por vía húmeda, logra la extracción del almidón contenido en las raíces de yuca. Este almidón se somete luego a una fermentación anaerobia espontánea y, posteriormente, a un secado con luz solar o artificial. El proceso comprende básicamente las siguientes etapas: **Recepción de las raíces:** una vez cosechadas las raíces deben ser transportadas a la planta de procesamiento dentro de las siguientes 24 - 48 horas para evitar su deterioro fisiológico y/o microbiano. **Lavado y pelado:** en esta etapa se elimina la tierra y las impurezas adheridas a las raíces. La cascarilla se desprende por la fricción de unas raíces con otras durante el proceso de lavado. **Rallado o desintegración:** en esta etapa se liberan los gránulos de almidón contenidos en las células de las raíces de la yuca. **Colado o extracción:** en esta etapa se realiza la separación de la pulpa o material fibroso de la lechada de almidón. **Sedimentación o deshidratación:** en esta etapa son separados los gránulos de almidón de su suspensión en agua y se realiza por medio de sedimentación o centrifugación. **Secado:** puede ser realizado por secado solar o artificial. En ambos casos, se busca remover entre el 12 y 13% de la humedad del almidón. **Acondicionamiento:** comprende las etapas de molienda, tamizado y empaque ([Aristizábal et al., 2007](#)).

La producción de almidón de yuca es una agroindustria y una fuente de ingresos en países como Tailandia, Vietnam, Brasil y Colombia, con una producción de 3 a 4 millones de toneladas por año (Sriroth *et al.*, 2000). Tailandia que es primer productor mundial de yuca, dedica más de la mitad de su producción de yuca para la extracción de almidón (Pingmuanglek *et al.*, 2017). En Colombia, la producción de almidón de yuca se realiza en algunos departamentos de la región Caribe y Pacífica. Los agronegocios dedicados a la producción del almidón de yuca son comúnmente denominados “rallanderías”. En el departamento del Cauca, que se ubica en la región sur occidental del país, un tamaño significativo de la población rural, además de transportadores, comerciantes e intermediarios, derivan sus ingresos, directos o indirectos, de esta actividad agroindustrial (Sarriá, 2012b).

De acuerdo con Sandoval (2002) en el departamento del Cauca se encuentran 210 pequeñas a medianas rallanderías que procesan aproximadamente 53000 ton de raíces de yuca al año, para producir alrededor de 11000 ton.año⁻¹ de almidón agrio de yuca, que representan el 80% de la producción total del país. En esta zona, la extracción de almidón de yuca como actividad agroindustrial se realiza en diferentes escalas: artesanal, semi-mecanizada y mecanizada totalmente. A nivel artesanal el proceso es realizado casi completamente de forma manual con el uso de herramientas de mano y generalmente, es hecho por grupos que emplean gran número de personas de la familia campesina, la producción varía entre 50 y 60 kg almidón por persona por día. En la manufactura de almidón a escala mediana semi-mecanizada, las operaciones de lavado y pelado se realizan en una máquina lavadora/peladora y el rendimiento es de 1 a 10 toneladas de almidón por día. Con la tecnología completamente mecanizada, hasta la cosecha se realiza mecanizada y el rendimiento se incrementa entre 15 y 150 toneladas de almidón por día (Aristizábal *et al.*, 2007).

1.9.1 AGUA RESIDUAL DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA

En general, durante la extracción del almidón de yuca se generan subproductos, como cáscaras, fibras lignocelulósicas mezcladas con almidón no extraíble (llamado bagazo en Colombia y Vietnam, y pulpa en Tailandia), una capa rica en proteínas depositada sobre el almidón sedimentado en el caso de tecnologías a pequeña escala, y agua residual proveniente del lavado y pelado y de los tanques o canales de sedimentación (Colin *et al.*, 2007, Tran *et al.*, 2015).

El agua residual del lavado y pelado de raíces de yuca, contiene una gran cantidad de material inerte con baja DQO. Mientras que el agua residual del drenaje del tanque de sedimentación de almidón, presenta mayor carga contaminante de DQO y DBO₅. Las características del agua residual dependen en gran medida del nivel de eficiencia de las máquinas utilizadas en la fábrica. En las rallanderías del norte del Cauca, una planta típica de almidón agrio, a menudo administrada por una familia, procesa diariamente entre 1 y 5 toneladas de raíces de yuca y consume alrededor de 12 m³ de agua por tonelada de raíces frescas de yuca (Torres *et al.*, 2010). En Tailandia, 1 kg de raíces frescas produce 0,2 kg de almidón y entre 5 y 7 L de agua residual (Leaño y Babel, 2012).

Este efluente se caracteriza por ser fácilmente acidificable con bajos valores de pH, altas concentraciones de materia orgánica (como DQO) y sólidos. Además de elevada acidez entre 400 y 1.500 mg CaCO₃.L⁻¹ y prácticamente ausencia de alcalinidad bicarbonática (Colin *et al.*, 2007, Pérez *et al.*, 2009). Sumado a lo anterior, el agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca contiene cianuro en concentraciones que pueden ser tóxicas y nocivas para los ecosistemas acuáticos (Sarriá, 2012b). En la Tabla 1.9 se detallan las características fisicoquímicas del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca que se genera en Colombia y otros países.

Tabla 1.9 Caracterización fisicoquímica agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca

Análisis	Unidades	Colombia ¹	Brasil ²	India ³	Tailandia ⁴	China ⁵
pH		3,6 – 6,5	4,0 – 5,0	4,5 – 4,8	3,59 – 5,52	4,50 – 4,92
DQO	mg.L ⁻¹	4.200 – 7.000	8.152 – 55.000	8.560 – 8.910	19.000 – 52.300	10.496
DBO	mg.L ⁻¹	1.100 – 3.900	11,32	5.810 – 6.020		6.300
Carbohidratos totales (CH)	mg.L ⁻¹	330 - 400	1.000- 30.000		9.600	
Nitrógeno	mg.L ⁻¹	80 -150	116,5 - 212		870	524,5
Fósforo	mg.L ⁻¹	20 -35	29,6 - 31		430	94
Relación DQO:N:P				100:0.7-1,9:2,3-3,9	100:0.7:2,3	
Cianuro total	mg CN.L ⁻¹	3 - 5				2,3
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	mg.L ⁻¹	45 – 2.050		1.240 – 1.695		827
Sólidos disueltos totales	mg.L ⁻¹	1.775		6.035 – 6.120		
Sólidos Totales (ST)	mg.L ⁻¹	1.820 – 6.600	2.252	7.275 – 7.815	12.180 – 38.200	
Sólidos Volátiles Totales (SVT)	mg.L ⁻¹	600 – 2.050	2.832	5.000 – 5.230	8.930 – 33.000	
Ácido láctico	mg.L ⁻¹	1.200 – 2.000				
Ácido acético	mg.L ⁻¹	330 - 400				

Fuente: ⁽¹⁾ Colin *et al.* (2007), Torres *et al.* (2008); ⁽²⁾ Hasan *et al.* (2015), Gomes *et al.* (2016), Torres *et al.* (2017); ⁽³⁾ Rajasimman y Karthikeyan (2007); ⁽⁴⁾ Sreethawong *et al.* (2010), O-Thong *et al.* (2011), Leño y Babel (2012), Intanoo *et al.* (2016); ⁽⁵⁾ Sun *et al.* (2012)

En Colombia, se genera una carga contaminante aproximada de 100 kg de DQO por tonelada de raíces y aunque, el agua residual que se genera en este sector es diluida, representa una fuente de contaminación y causa problemas ambientales a la población rural cercana (Colin *et al.*, 2007).

1.9.2 TRATAMIENTO ANAEROBIO DEL AGUA RESIDUAL DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA

En Colombia, el tratamiento anaerobio del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca ha sido ampliamente estudiado (Gottret *et al.*, 1997, Torres *et al.*, 2003, Torres *et al.*, 2005b, Pérez *et al.*, 2006, Torres *et al.*, 2008). La DA ha presentado excelentes resultados a pesar de su contenido de cianuro (3,5 mg.L⁻¹) y acidez (pH 4,5 – 5,5) (Gijzen *et al.*, 2000). Entre las ventajas se tiene su bajo costo de implementación y operación, bajo consumo de energía, poca generación de lodo y tolerancia a sobre cargas orgánicas e hidráulicas (Chernicharo, 2007).

Diversas investigaciones han concluido que el “filtro anaerobio de flujo mixto (ascendente y descendente)” es el reactor que mejor se adapta a las características del agua residual del proceso de

extracción de almidón de yuca, debido a que es la tecnología que mejor responde ante la discontinuidad en el proceso productivo, característico de las rallanderías del norte del Cauca (Torres *et al.*, 2003, Pérez *et al.*, 2006, Colin *et al.*, 2007, Pérez *et al.*, 2009). En una evaluación similar, con un filtro a anaerobio de flujo vertical y horizontal a escala real Torres *et al.* (2005b) reportaron que con flujo vertical con TRH de 15,6 h las eficiencias de remoción de DQO y SST fueron 70 y 90% respectivamente, y con flujo horizontal con TRH menor (14 h) obtuvieron una eficiencia de remoción de 79 y 90% para DQO y SST respectivamente. La inclusión de baffles también favoreció la separación de fases.

Ferraz *et al.* (2009) evaluaron un reactor anaerobio con baffles para el tratamiento de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. El uso de los baffles permitió el establecimiento de bacterias acidogénicas en el primer compartimiento y arqueas metanogénicas en el último. Durante el arranque se aplicó una COV baja ($0,5 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) y, el ajuste del pH se realizó a través de la adición de bicarbonato de sodio. En condiciones estables de operación, observaron eficiencias de reducción de DQO del 92% con TRH de 3,5 d. Por su parte, Su *et al.* (2017) emplearon un reactor anaerobio de tercera generación, para estudiar el desempeño y estructura de la comunidad microbiana de un reactor anaerobio con recirculación interna, para el tratamiento de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. Con TRH de 12 h y recirculación de 4 se obtuvo el mejor desempeño, producción de biogás de $25 \text{ L} \cdot \text{d}^{-1}$ a una tasa de $0,42 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \cdot \text{kg}^{-1} \text{ DQO}$.

Por su parte, Pérez *et al.* (2006) y Colin *et al.* (2007) recomiendan aplicar COV entre 6,0 y 12 $\text{kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ para la DA en una sola fase del agua residual del proceso de extracción de almidón yuca. Para neutralizar la acidez de este tipo de efluente, Torres *et al.* (2008) recomiendan el uso de bicarbonato de sodio, debido a que garantiza suficiente capacidad “buffer” durante el tratamiento anaerobio. Con relación al control del proceso, Pérez y Torres (2008) advierten sobre la importancia de los índices de alcalinidad y establecieron que para este tipo de agua residual, en condiciones estables, el índice tampón o buffer (IB) varía entre 0,20 y 0,35, el índice AI/AP entre 0,40 y 0,55 y el índice α es superior a 0,65.

Sobre los requerimientos nutricionales para la DA del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, Colin *et al.* (2007) indicaron que la relación DQO:N:P (192:4:1) que presentó este efluente fue suficiente para su bioconversión a metano, por lo que no fue necesaria la adición de nutrientes.

La DA en dos fases también ha sido evaluada como alternativa para el tratamiento de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. Rojas (1999) estudió la DA en dos fases utilizando un RA que simuló una mezcla completa y un reactor UASB para la fase metanogénica. El RA que fue evaluado con una COV entre 10,5 y 46,3 $\text{kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, TRH entre 10,4 y 1,9 h y pH entre 5,8 y 6,2, presentó una baja reducción de DQO (20%), su principal función fue la transformación del ácido láctico en ácido acético (50%), propiónico (30%) y butírico (20%). Mientras que, el RM se sometió a una COV de 2,23 $\text{kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, TRH de 23 h, con IB de 0,13 e índice α de 0,86. La eficiencia global de remoción de DQO fue 85,4%, con una tasa de producción de biogás de $36,5 \text{ L} \cdot \text{d}^{-1}$.

En una exploración del tratamiento de “manipueira” a través de la DA en dos fases, empleando un reactor completamente mezclado para la fase acidogénica y un reactor híbrido (UASB + lecho fijo) para la fase metanogénica, a temperatura ambiente, Paixão *et al.* (2000) reportaron la producción de $14,4 \text{ L}_{\text{biogás}} \cdot \text{d}^{-1}$ en el RM con una concentración de metano de 80%. Esta investigación reveló que en el RA ocurre la reducción del cianuro (90%) y son los bacilos fermentativos los responsables de esta transformación, también que predominan en esta fase los ácidos propiónico, n-butírico y n-valérico. Mientras que, en el RM predominan arqueas metanogénicas del género *Methanosaeta*, responsables de la alta reducción de materia orgánica (96%) y producción de metano. La estabilidad del RM fue obtenida con un IB entre 0,018 y 0,08.

Otras configuraciones más complejas también han sido estudiadas para el tratamiento anaerobio del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. [Sun et al. \(2012\)](#) describen un reactor anaerobio de etapas múltiples y flujo ascendente diseñado para superar las deficiencias del reactor anaerobio convencional, y para evaluar su aplicación en el tratamiento de este tipo de agua residual después de la eliminación de sólidos en suspensión. El cuerpo principal del reactor tenía un separador de gas-líquido y dos separadores de gas-líquido-sólido, un área de tratamiento fino y una de manto de lodo expandido. Los dos separadores gas-líquido-sólido se ubicaron en el medio del reactor para evitar el lavado del lodo anaerobio y el separador gas-líquido se instaló en la parte superior del sistema, conectado con los dos separadores de gas-líquido-sólido. Esta configuración permitió un arranque rápido (22 d), que al ser operado con un TRH de 6 h y una DQO afluente de 4000 mg.L⁻¹, en condiciones mesofílicas (37°C) presentó una reducción de DQO entre 77,5 y 92 % con una COV aplicada entre 10,2 y 40 kg DQO.(m³.d)⁻¹. *Methanosaeta spp* y *Methanosarcina spp* fueron los microorganismos dominantes en el lodo.

1.10 PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO Y METANO A PARTIR DE AGUA RESIDUAL DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN DE YUCA

Generando ecuaciones de búsqueda en bases bibliográficas con palabras claves como “cassava wastewater, cassava starch, biohydrogen, dark fermentation, biological hydrogen production, methane, hydrogen, anaerobic digestion, two-phases” se puede establecer que, en la última década el agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca es un sustrato de interés creciente para la producción conjunta H₂ y CH₄. Algunos de los estudios relacionados con la producción de H₂ y CH₄ a través de la **DA** en dos fases se presentan en la Figura 1.4.

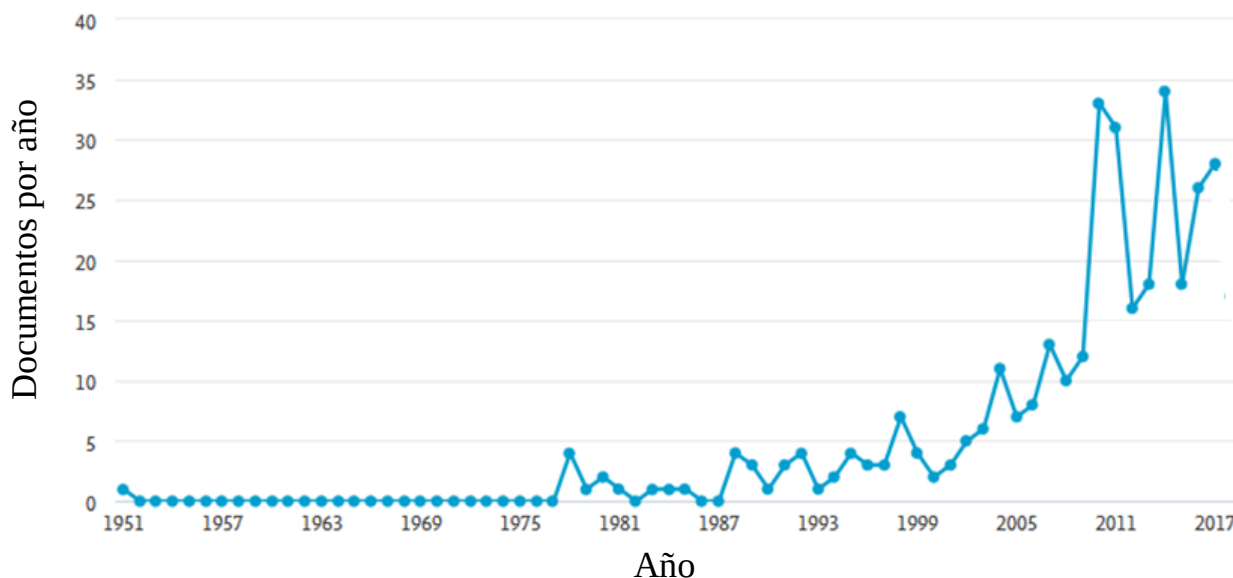


Figura 1.4 Cantidad de artículos científicos relacionados con la producción de H₂ y/o CH₄ involucrando la digestión anaerobia y residuos del proceso de extracción de almidón de yuca

Realizada a través de Scopus con 262 documentos

Gracias a su contenido de almidón y carbohidratos fermentables, este residuo se ha constituido en una fuente renovable interesante para la producción de hidrógeno vía fermentación oscura, y su potencial de aplicación ha sido estudiado a pequeña escala en reactores en flujo discontinuo y flujo continuo ([Lazaro et al., 2015](#)). Recientemente, una evaluación energética y económica mostró a través de una simulación

computacional, que conectar la producción de hidrógeno a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, con los agronegocios de producción de almidón de yuca produce un valor agregado al proceso principal, porque permite un mayor uso de la yuca y sus subproductos. Además, representa una opción para la generación de energía en las zonas rurales, donde generalmente se ubican las plantas de procesamiento de yuca. El estudio mostró que la eficiencia exergética global de una planta de tratamiento de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca fue de 79% y el costo de producir hidrógeno es de 0,13 US.kW⁻¹.h⁻¹ (Madeira *et al.*, 2017).

Los estudios en flujo discontinuo han evaluado principalmente el efecto de la concentración del sustrato, pretratamiento del inóculo y temperatura. Cappelletti *et al.* (2011) estudiaron el efecto de la concentración inicial de sustrato (5,0, 7,5, 10,7, 15,0 y 30,0 g DQO.L⁻¹) sobre la producción de H₂ y eficiencia de reducción de DQO (%). Encontraron que las concentraciones de DQO más favorables eran 5,0, 7,5 y 10,7 g.L⁻¹, debido a que generaban mayores rendimientos (2,41, 1,2 y 1,34 mol H₂.mol⁻¹ glucosa) y reducciones de DQO (33, 25 y 42 %). Con concentraciones superiores, la producción de AGV no disociados llevó el pH (4,0) del medio a niveles inhibitorios para los microorganismos acidogénicos, lo que se vio reflejado en los bajos rendimientos de H₂ (1,00 y 0,60 mol H₂.mol⁻¹ glucosa) y menores reducciones de DQO (35 y 17 %), respectivamente.

Lamaison *et al.* (2014) evaluaron la eficacia de tres tipos de pretratamiento (térmico, lavado y combinado) para enriquecer un lodo metanogénico con BPH. Los resultados mostraron que el lavado del lodo como método de pretratamiento fue más efectivo en términos de producción de H₂, porque garantizó una mayor diversidad de BPH, comparado con el pre-tratamiento térmico; pues este último, así como favoreció la selección de bacterias formadoras de esporas como los *Clostridium*, también eliminó otras bacterias que podían contribuir con la producción de H₂. Específicamente, con el lavado del lodo se consiguió un potencial de producción de 44,6 mL H₂ y un porcentaje de reducción de DQO del 5,4%.

La efectividad del pretratamiento térmico para inhibir producción de metano también ha sido demostrada usando agua residual de procedencia similar, Leañó y Babel (2012) aplicaron un pretratamiento térmico (105°C, 90 min) sobre un inóculo mixto en su estudio de producción de hidrógeno a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. El sustrato fue hidrolizado a través de tres diferentes pretratamientos (i) sonicación, (ii) Mezcla de enzimas que modifican los carbohidratos que diferentes al almidón, el material denominado OPTIMASH BG® y (iii) la enzima α -amilasa que hidroliza los enlaces glucosídicos en polisacáridos, produciendo dextrinas y oligo y monosacáridos. Sus resultados mostraron una reducción de DQO del 60% aplicando el pretratamiento α -amilasa sobre el agua residual y, no observaron producción de metano, con lo cual concluyeron la eficiencia del pretratamiento térmico para inhibir BCH y, que es posible incrementar el rendimiento de hidrógeno sometiendo el sustrato a pretratamientos que aceleren su hidrólisis.

Evaluaciones en rango termofílico (60°C) reportan una producción de hidrógeno entre 125 y 249 mL H₂.g⁻¹ almidón, asociadas con la fermentación de ácido acético a etanol y ácido acético a láctico. Los microorganismos involucrados en la fermentación del sustrato fueron bacterias degradadoras de almidón y BPH, a través de análisis filogenéticos demostraron la presencia de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Anoxybacillus sp.*, *Geobacillus sp.* y *Clostridium sp* (O-Thong *et al.*, 2011).

En flujo discontinuo, a través de la combinación entre la fermentación oscura y foto fermentación, ha sido demostrada la producción de hidrógeno a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, con resultados interesantes que muestran que el rendimiento de hidrógeno se incrementa de 17,5-18,6% a 26,4-27,1% al combinar estos procesos (Su *et al.*, 2009). Aplicando solo foto fermentación

y agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca previamente hidrolizada [Lazaro et al. \(2015\)](#) obtuvieron un rendimiento de $1,1 \text{ mmol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ de glucosa removida. Además, observaron una inhibición en la producción de hidrógeno al incrementar la concentración del sustrato, la cual se asoció con una inhibición del metabolismo celular por sustancias tóxicas.

[Tien et al. \(2017\)](#) aplicando una superficie de respuesta, demostraron que temperatura, pH y cantidad de inóculo son tres factores importantes que tienen un efecto significativo sobre el rendimiento de hidrógeno, usando como sustrato agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. Recientemente, [Amorim et al. \(2018\)](#) usando “manipueira” como sustrato para la producción de hidrógeno, con concentraciones de DQO entre 10 y $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ mostraron que la inhibición de la metanogénesis, el tipo de inóculo y la carga orgánica son factores que todavía limitan el proceso de producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura. La producción potencial máxima de H_2 ($\sim 563 \text{ mL}$) obtenida con pretratamiento térmico (120°C , 30 min) fue mayor que con el pretratamiento con acetileno, el ácido butírico fue el metabolito soluble predominante. El incremento en la DQO tuvo un efecto contrario sobre la producción de H_2 e incrementó la fase de latencia.

En flujo continuo, diferentes configuraciones de reactores se han empleado para la producción de hidrógeno a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. [Sreethawong et al. \(2010\)](#) estudió el efecto de parámetros de operación, relación DQO:N y la composición de los ácidos orgánicos sobre la producción de H_2 . En su estudio emplearon un reactor anaerobio secuencial (ASBR por sus siglas en inglés) aplicando una COV de $30 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ y seis ciclos por día. Sus resultados mostraron que un exceso de nitrógeno promueve una mayor producción de ácidos orgánicos y etanol, lo que conduce a una disminución de la eficiencia de producción de hidrógeno. Con una relación DQO:N de 100:2,2 se obtuvo una tasa de producción específica máxima de $524 \text{ mL H}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{SSV} \cdot \text{d}^{-1}$ y un rendimiento de hidrógeno de $438 \text{ mL H}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{removida}}$. La eficiencia de reducción de DQO alcanzó el máximo de 67%.

[Reginatto et al. \(2011\)](#) usando un ASBR evaluaron el efecto de la adición de nutrientes sobre la producción de H_2 . Durante los primeros 65 días el proceso se evaluó sin la adición de nutrientes, en el día 66 y hasta el día 120 se evaluó con la adición de nutrientes. Los resultados mostraron que sin la adición de nutrientes el proceso generaba un rendimiento de $323 \text{ mL H}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}$, mientras que con la adición producía $153.5 \text{ mL H}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{DQO}$. De acuerdo con los autores, la adición de nutrientes (NH_4Cl , K, Na, Mg, Fe, Mn y PO_4) incentivó el crecimiento de bacterias ácido lácticas, las cuales secretan antibióticos o bacteriocinas que inactivan el desarrollo de bacterias acidogénicas productoras de H_2 .

El efecto adverso de las bacterias ácido lácticas sobre la producción de hidrógeno fue reportado por [Gomes et al. \(2016\)](#), quienes evaluaron el desempeño de un reactor anaerobio de tubos múltiples continuos para promover la descarga de biomasa y evitar la acumulación de sólidos. Los resultados de esta investigación se tornaron más interesantes debido a que, asociaron la baja producción de hidrógeno con la presencia de bacteriocinas (Nisina A y Nisina Z) y bacterias ácido lácticas en el agua residual.

Los reactores de crecimiento adherido también han sido empleados para estudiar la producción de hidrógeno con este residuo agroindustrial. [Amorim et al. \(2014\)](#) por su parte estudiaron el efecto del TRH y COV sobre en la producción biológica de hidrógeno usando un reactor anaerobio de medio fluidizado; el reactor fue operado para mantener un pH efluente de 5,5. Con TRH de 1 h y COV de $161 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ obtuvieron un rendimiento máximo de $2,04 \text{ L H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ y tasa de producción específica $1,91 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$ glucosa. El contenido de hidrógeno en el biogás fue 48% y el principal metabolito soluble fue ácido acético. Las ventajas de esta configuración se encuentran en la acumulación de grandes cantidades de biomasa unida al medio de soporte, aplicación de altas tasas de carga orgánica, bajos TRH y buenas características de

mezcla, que optimizan la transferencia de masa entre el sustrato y los microorganismos. Además, permite la agitación a alta velocidad en la fase líquida, lo que favorece la liberación de hidrógeno.

Torres *et al.* (2017) abordaron el efecto del tipo de medio de soporte sobre el proceso. Para suprimir la actividad de BCH aplicaron un pretratamiento térmico (95°C, 15 min) sobre el inóculo; obtuvieron buenos resultados con pH inicial de 4,5 y 6,0, a una COV de 9,5 g.L⁻¹.d⁻¹ y TRH de 4 h; concluyeron que los tallos de bambú favorecen el rendimiento de H₂ (0,86 mmol H₂. mol⁻¹ CH) seguido de medio plásticos como polietileno. Con COV superiores favorecieron la solventogénesis con la subsecuente disminución del rendimiento, del flujo molar y del rendimiento de hidrógeno. Advierten que la acumulación de biomasa puede conducir a cambios en las rutas metabólicas, reduciendo el rendimiento de hidrógeno.

Los reactores de medio suspendido han sido poco estudiados para la producción de hidrógeno con agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. Jiang *et al.* (2017) se interesaron en estudiar el desempeño a largo plazo de la producción de hidrógeno vía fermentación oscura a temperatura termofílica (55°C), utilizando un reactor anaerobio completamente mezclado, operado con un TRH de 30 d. Adicionaron 4 g NH₄HCO₃.L⁻¹ como fuente de nitrógeno para mantener una relación DQO: N de 100:1. Sus resultados demuestran que la relación DQO:N influye en la síntesis celular y crecimiento de microorganismos, y tiene un efecto en cada uno de los tres pasos metabólicos de la fermentación: hidrólisis, acidogénesis y producción de hidrógeno. Los principales subproductos metabólicos solubles fueron ácido acético, ácido butírico y etanol.

Las experiencias en flujo continuo que abordan la producción conjunta de H₂ y CH₄ son escasas. Intanoo *et al.* (2014) investigaron la producción separada de H₂ y CH₄ utilizando dos reactores UASB en rango termofílico. El RM se alimentó con todo el efluente proveniente del reactor productor de hidrógeno (RA), el pH en este reactor se mantuvo en 5,5 y la COV aplicada fue de 90 kg DQO.m⁻³.d⁻¹, el gas producido a partir de esta unidad contenía principalmente H₂ y CO₂, con un rendimiento máximo de hidrógeno de 54,22 mL de H₂.g⁻¹ DQO_{aplicada} y la tasa específica de producción de hidrógeno fue de 197,17 mL H₂.g⁻¹ SSV.d⁻¹. La misma carga orgánica volumétrica fue aplicada al RM, el gas producido a partir de esta unidad principalmente contenía CH₄ y CO₂ sin H₂, resultados que fueron consistentes con el rendimiento máximo de metano alcanzado de 164,87 mL CH₄.g⁻¹ DQO_{aplicada} y la tasa de producción de metano específica de 356,31 mL CH₄.g⁻¹ SSV.d⁻¹.

Intanoo *et al.* (2016) usaron dos reactores UASB para producir H₂ y CH₄ a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, haciendo énfasis en la máxima producción del H₂. El inóculo para el reactor productor de hidrógeno fue sometido a un pretratamiento térmico (95°C, 15 min). El agua residual presentó una concentración inicial de DQO entre 19.000 y 22.000 mg.L⁻¹ y fue adicionado bicarbonato de amonio (NH₄HCO₃) para corregir la relación DQO:N:P (100:1:2,3). El primer reactor fue evaluado a 37°C y pH 5,5, alcanzó condiciones estables en 10 días y una reducción máxima de DQO de 43,8%; la tasa máxima de producción específica de hidrógeno (0,39 L H₂.L⁻¹.d⁻¹) y el rendimiento máximo (39,83 L CO₂. kg⁻¹ DQO) fueron obtenidos con una COV de 25 kg.m⁻³.d⁻¹, el biogás producido contenía 36,4% H₂ y 63,6% CO₂. El RM presentó una reducción máxima de DQO de 93,2% con un COV de 8 kg.m⁻³.d⁻¹; la tasa máxima de producción específica fue 0,91 L CH₄. L⁻¹.d⁻¹ y el rendimiento específico máximo fue 115,23 L CH₄. kg⁻¹ DQO_{removida}. De sus resultados también se resalta que la inhibición de los organismos acidogénicos y metanogénicos por ácidos orgánicos fue encontrada con 10.000 y 400 mg ácido acético.L⁻¹, respectivamente.

Por su parte, Jiraprasertwong *et al.* (2019) estudiaron la producción de H₂ y CH₄ a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, con énfasis en la producción de metano; empleando tres reactores UASB en serie con recirculación a los dos primeros reactores. Para mantener en 5,5 el pH del

efluente del primer reactor se adicionó NaOH (4% w/v) y no fue necesario ajustar el pH en los dos últimos reactores; el agua residual presentó una relación DQO:N:P de 100:2,02:0,54 y DQO entre 18.000 y 20.000 mg.L⁻¹. Las condiciones estables fueron alcanzadas en 4 semanas. Con una COV de 15 kg.m⁻³.d⁻¹ el sistema alcanzó la más alta remoción de DQO (92.5%) y el más alto rendimiento de H₂ (0,43 mL H₂. g⁻¹ DQO aplicada) y CH₄ (328 mL CH₄. g⁻¹ DQO aplicada). El bajo rendimiento de H₂ fue atribuido a la recirculación que promovió la presencia de metanógenos en el primer y segundo reactor.

Por otro lado, los residuos del procesamiento de yuca que se componen de fibras naturales de lignocelulosa han sido usados para la coproducción de H₂ y CH₄, [Cheng et al. \(2017\)](#) aplicando un pretratamiento (líquido iónico de N-metilmorfolina-N-óxido) para aacelerar la hidrólisis enzimática de los residuos lignocelulósicos del procesamiento de yuca obtuvo rendimientos de hidrógeno y metano de 126 mL.g⁻¹ SV y 101 mL.g⁻¹ SV, respectivamente.

1.11 CONSIDERACIONES FINALES

La producción conjunta de hidrógeno y metano a partir de residuos agroindustriales es una alternativa que soporta su investigación y desarrollo con un doble beneficio ambiental: (i) *producir fuentes alternativas de energía a partir de materiales limpios y sustentables* y, (ii) *estabilizar residuos agroindustriales minimizando su efecto adverso sobre el ambiente*. Incluir la producción biológica de hidrógeno como un objetivo del tratamiento anaerobio del agua residual agroindustrial también revaloriza los sistemas agroindustriales, en este caso particular el proceso de extracción de almidón de yuca, porque posibilita la generación de otros metabolitos de alto valor agregado como los ácidos grasos volátiles (ej. ácido acético, butírico, etanol etc).

Visualizar la producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura como una reconversión de un proceso que se ha empleado por décadas, permite aprovechar todo el conocimiento o “*background*” que se ha generado a través del estudio, evaluación y aplicación de la DA en dos fases, para avanzar rápidamente en la resolución de los desafíos de este proceso, como son el rendimiento molar, producción volumétrica, estabilidad en la producción de hidrógeno y eficiencia en la transformación y estabilización de la materia orgánica. Así como, para comprender las limitaciones propias del proceso ya sean físicas o químicas como la transferencia de masa, la presión parcial de hidrógeno, y otras relacionadas con la termodinámica y cinética.

Los conceptos teóricos e investigaciones presentadas en la revisión de literatura, demuestran el potencial de producción de hidrógeno a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca vía fermentación oscura. Por lo tanto, el paso siguiente es explorar a través de la investigación aplicada, las condiciones más apropiadas para producir hidrógeno de manera continua y eficiente, además de acoplar la producción de hidrógeno con un proceso que cierre el ciclo de estabilización de la materia orgánica. Debido a que ya ha sido ampliamente demostrada la producción de metano como resultado del tratamiento anaerobio de agua residual del proceso extracción de almidón de yuca, resulta natural acoplar la producción de hidrógeno vía fermentación oscura con la fase metanogénica de la DA, y de esta manera mejorar la recuperación de energía limpia en forma de H₂ y CH₄ y reducir el contenido de materia orgánica (estabilización del residuo).

En un proceso como la fermentación oscura que es ampliamente dominado por microorganismos, la selección y optimización de las variables de control y operación de los reactores es función de los requerimientos nutricionales, cinéticos y ambientales de los microorganismos. Es así como las investigaciones en producción biológica de hidrógeno (vía fermentación oscura) indican que el pH es una variable tanto de control como de operación, debido a que en el rango ácido permite suprimir a las BCH e

incentivar a las BPH, pero también obliga a las BPH a modificar su metabolismo en detrimento de la producción de hidrógeno cuando las condiciones son adversas, por lo tanto, su efecto y el rango apropiado para la operación continua de un reactor productor de hidrógeno (denominado también acidogénico, hidrogenogénico o biohidrogenador) es continuamente estudiado y difícilmente, habrá un consenso para establecer un único valor que pueda ser extrapolado en todas las investigaciones.

Por su parte, el uso de inóculos anaerobios mixtos posibilita la producción fermentativa de hidrógeno a partir de sustratos reales, que en su mayoría no son inocuos y pueden contener contaminantes para los cuales los inóculos puros no están preparados. Sin embargo, para usar inóculos mixtos es necesaria la eliminación de las BCH que naturalmente coexisten con BPH. Para tal fin, pretratamientos de tipo térmico, químico y mecánico han sido empleados con éxito, también han sido investigadas estrategias de tipo operacional como aplicar TRH cortos para lavar microorganismos de lento crecimiento como las BCH. En cualquier caso, es necesario aplicar algún pretratamiento para usar inóculos mixtos y, su elección depende tanto de su efectividad para controlar a las BCH como de las implicaciones que este tenga en el escalonamiento de la tecnología.

De otro lado, la relación S/X y COVe que son variables homólogas, han sido identificadas como variables de gran importancia e influencia sobre la producción continua de hidrógeno. En estudios en flujo discontinuo, fijar y mantener su valor puede ser relativamente sencillo, por lo que estimar un rango adecuado en función del sustrato puede parecer irrelevante. Sin embargo, en flujo continuo su estudio y control resulta de mayor complejidad, debido a la acumulación de biomasa dentro del reactor causada por el rápido crecimiento de los microorganismos o por la pérdida constante de biomasa causada por elevadas velocidades de flujo asociadas a bajos TRH, en los dos casos la COVe es continuamente modificada impidiendo su control. El primer caso, cuando la concentración del sustrato es constante, la acumulación progresiva del sustrato desarrolla un ambiente en el que hay poca disponibilidad de sustrato por unidad de microorganismo, es decir bajas COVe, lo cual obliga a los microorganismos a modificar su metabolismo hacia rutas metabólicas que les permitan obtener energía para su sostenimiento celular, alejándose de la producción de hidrógeno. El segundo caso, las bajas concentraciones de biomasa derivan en elevadas COVe, que combinadas con altas concentraciones de sustrato pueden ser insuficientes para la utilización del mismo y por lo tanto, para la producción de hidrógeno.

Con relación a la COVe no solo basta con encontrar el mejor rango para optimizar la producción de hidrógeno a partir de un determinado sustrato, también es necesario establecer métodos adecuados para su manipulación y control. Dada la importancia de la COVe en la producción de hidrógeno esta debería ser un parámetro de diseño y operación de los reactores productores de hidrógeno, sin embargo, las configuraciones actuales de los reactores presentan limitaciones para su control. Los reactores de crecimiento adherido no permiten un adecuado control del contenido de biomasa, la cual tiende a acumularse con largos periodos de operación, y su valor solo se cuantifica al final del proceso. Por su parte, los reactores de crecimiento suspendido, aunque facilitan el control del contenido de biomasa, no permiten el desacople entre el TRH y el TRC (tiempo de retención celular) por lo que obligan a usar altos TRH que no son deseables en la producción biológica de hidrógeno, debido a que favorecen la propagación de arqueas metanogénicas consumidoras de hidrógeno. Así, la COVe es una variable de gran interés que requiere mayor estudio e investigación para incrementar la producción continua y estable de hidrógeno a través de la fermentación oscura.

De esta manera, para intentar formular condiciones adecuadas para la producción de hidrógeno a partir de la DA en dos fases del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, el siguiente trabajo presenta tanto la evaluación de cuatro factores que influyen preponderantemente en la producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura (pH, pretratamiento del inóculo, relación S/X y COVe)

como el análisis del uso del efluente de un RA para la producción de metano a través del acople entre dos reactores anaerobios, Reactor Anaerobio de Manto Expandido (RA) y Reactor Anaerobio de Crecimiento Adherido y Flujo mixto (RM) para estudiar la producción conjunta de hidrógeno y metano con énfasis en el periodo de arranque del RM.

1.12 REFERENCIAS DEL CAPÍTULO 1

- ABBASI, T.; TAUSEEF, S. M. & ABBASI, S. A. (2012). Anaerobic digestion for global warming control and energy generation—An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 3228-3242.
- ALARCÓN MORANTE, F.; DUFOUR, D.; RIVIER, M.; MORENO, M. A. & RUIZ, R. (1998). Almidón agrio de yuca en Colombia. *Publicación CIAT*.
- ALZATE, M. E.; MUNOZ, R.; ROGALLA, F.; FDZ-POLANCO, F. & PEREZ-ELVIRA, S. I. (2012). Biochemical methane potential of microalgae: influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. *Bioresour Technol*, 123, 488-94.
- AMANI, T.; NOSRATI, M. & MOUSAVI, S. (2011). Differences between Mesophilic and Thermophilic Anaerobic Syntrophic Digestion of Volatile Fatty Acids in a Continuous Reactor. *International Conference on Chemical, Biological and Environment Sciences (ICCEBS'2011)*. Bangkok.
- AMANI, T.; NOSRATI, M. & SREEKRISHNAN, T. (2010). Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects—a review. *Environmental Reviews*, 18, 255-278.
- AMORIM, N. C. S.; ALVES, I.; MARTINS, J. S. & AMORIM, E. L. C. (2014). Biohydrogen Production from Cassava Wastewater in an Anaerobic Fluidized Bed Reactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31, 603-612.
- AMORIM, N. C. S.; AMORIM, E. L. C.; KATO, M. T.; FLORENCIO, L. & GAVAZZA, S. (2018). The effect of methanogenesis inhibition, inoculum and substrate concentration on hydrogen and carboxylic acids production from cassava wastewater. *Biodegradation*, 29, 41-58.
- ANDERSON, G. K.; KASAPGIL, B. & INCE, O. (1994). Microbiological study of two-stage anaerobic digestion during start-up. *Water Research*, 28, 2383-2392.
- ANGELIDAKI, I.; ALVES, M.; BOLZONELLA, D.; BORZACCONI, L.; CAMPOS, J. L.; GUWY, A. J.; KALYUZHNYI, S.; JENICEK, P. & VAN LIER, J. B. (2009). Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Sci Technol*, 59, 927-34.
- ANZOLA-ROJAS, M. D. P.; GONCALVES DA FONSECA, S.; CANEDO DA SILVA, C.; MAIA DE OLIVEIRA, V. & ZAIAT, M. (2015). The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. *Biotechnol Rep (Amst)*, 5, 46-54.
- ANZOLA ROJAS, M. D. P. (2014). *Estratégias para a produção contínua de hidrogênio em reator anaeróbico de leito fixo*. Doutor em Ciencias: Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo.
- APPELS, L.; BAEYENS, J.; DEGRÈVE, J. & DEWIL, R. (2008). Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 755-781.
- AQUINO, S. & CHERNICHARO, C. (2005a). Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 10, 152-161.
- ARIAS, E. & RODRÍGUEZ, C. (2013). Estudio de la producción de hidrógeno en régimen batch con agua residual proveniente de la industria cervecera.

- ARISTIZÁBAL, J.; SÁNCHEZ, T. & LORÍO, D. M. (2007). *Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca*, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Roma.
- AROOJ, M. F.; HAN, S. K.; KIM, S. H.; KIM, D. H. & SHIN, H. S. (2008). Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 3289-3294.
- BAGHCHEHSARAEI, B.; NAKHLA, G.; KARAMANEV, D. & MARGARITIS, A. (2010). Fermentative hydrogen production by diverse microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 5021-5027.
- BALACHANDAR, G.; KHANNA, N. & DAS, D. (2013). Chapter 6 - Biohydrogen Production from Organic Wastes by Dark Fermentation. In: LARROCHE, A. P.-S. C. C. H. (ed.) *Biohydrogen*. Amsterdam: Elsevier.
- BALAGUER, M.; CASSU, C.; VICENT, T. & PARIS, J. (1992). Start-up of an UASB reactor treating potato-starch wastewater using an alkalimetric follow-up procedure. *Biomass and Bioenergy*, 3, 389-392.
- BATSTONE, D. J.; KELLER, J.; ANGELIDAKI, I.; KALYUZHNYI, S.; PAVLOSTATHIS, S.; ROZZI, A.; SANDERS, W.; SIEGRIST, H. & VAVILIN, V. (2002). The IWA Anaerobic Digestion Model No 1(ADM 1). *Water Science & Technology*, 45, 65-73.
- BLANCO, V. M. C.; FUESS, L. T. & ZAIAT, M. (2017). Calcium dosing for the simultaneous control of biomass retention and the enhancement of fermentative biohydrogen production in an innovative fixed-film bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 12181-12196.
- BOUALLAGUI, H.; BEN CHEIKH, R.; MAROUANI, L. & HAMDI, M. (2003). Mesophilic biogas production from fruit and vegetable waste in a tubular digester. *Bioresource Technology*, 86, 85-89.
- BREUNINGER, W. F.; PIYACHOMKWAN, K. & SRIROTH, K. (2009). Chapter 12 - Tapioca/Cassava Starch: Production and Use. In: BEMILLER, J. & WHISTLER, R. (eds.) *Starch (Third Edition)*. San Diego: Academic Press.
- BUITRÓN, G.; KUMAR, G.; MARTINEZ-ARCE, A. & MORENO, G. (2014). Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H₂-SBR + CH₄-UASB) using tequila vinasses. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, 19249-19255.
- 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, 3367-3372.
- CASTELLÓ, E.; GARCÍA Y SANTOS, C.; IGLESIAS, T.; PAOLINO, G.; WENZEL, J.; BORZACCONI, L. & ETCHEBEHERE, C. (2009). Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 5674-5682.
- CASTRO-MOLANO, L. D. P.; ESCALANTE-HERNÁNDEZ, H.; GÓMEZ-SERRATO, O. J. & JIMÉNEZ-PIÑEROS, D. P. (2016). Analysis of methanogenic and energetic potential from slaughterhouse wastewater using anaerobic digestion. *Dyna*, 83, 41-49.
- CASTRO-VILLALOBOS, M.; GARCÍA-MORALES, J. & FERNÁNDEZ, F. (2012a). By-products inhibition effects on bio-hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 7077-7083.
- CAVINATO, C.; DA ROS, C.; PAVAN, P. & BOLZONELLA, D. (2017). Influence of temperature and hydraulic retention on the production of volatile fatty acids during anaerobic fermentation of cow manure and maize silage. *Bioresource Technology*, 223, 59-64.

- CHAN, Y. J.; CHONG, M. F. & LAW, C. L. (2012). An integrated anaerobic–aerobic bioreactor (IAAB) for the treatment of palm oil mill effluent (POME): Start-up and steady state performance. *Process Biochemistry*, 47, 485-495.
- CHEN, W.; CHEN, S.; KUMARKHANAL, S. & SUNG, S. (2006). Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 2170-2178.
- CHENG, J.; ZHANG, J.; LIN, R.; LIU, J.; ZHANG, L. & CEN, K. (2017). Ionic-liquid pretreatment of cassava residues for the cogeneration of fermentative hydrogen and methane. *Bioresour Technol*, 228, 348-354.
- CHERNICHARO, C. (2007). *Reactores anaerobios-Principios del Tratamiento Biológico de Aguas Residuales*.
- CHERNICHARO, C. A. D. L. (1997b). *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*.
- CHRISTY, P. M.; GOPINATH, L. & DIVYA, D. (2014). A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, 167-173.
- CHUDоба, P.; CAPDEVILLE, B. & CHUDоба, J. (1992). Explanation of Biological Meaning of the So/Xo Ratio in Batch Cultivation. *Water Science and Technology*, 26, 743-751.
- COHEN, A.; ZOETEMEYER, R. J.; VAN DEURSEN, A. & VAN ANDEL, J. G. (1979). Anaerobic digestion of glucose with separated acid production and methane formation. *Water Research*, 13, 571-580.
- 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. *Bioresour Technol*, 98, 1602-7.
- COONEY, M.; MAYNARD, N.; CANNIZZARO, C. & BENEMANN, J. (2007). Two-phase anaerobic digestion for production of hydrogen-methane mixtures. *Bioresour Technol*, 98, 2641-51.
- COONEY, M. J.; LEWIS, K.; HARRIS, K.; ZHANG, Q. & YAN, T. (2016). Start up performance of biochar packed bed anaerobic digesters. *Journal of Water Process Engineering*, 9, e7-e13.
- CRESSON, R.; CARRÈRE, H.; DELGENÈS, J. P. & BERNET, N. (2006). Biofilm formation during the start-up period of an anaerobic biofilm reactor—Impact of nutrient complementation. *Biochemical Engineering Journal*, 30, 55-62.
- DALIS, D.; ANAGNOSTIDIS, K.; LOPEZ, A.; LETSIOU, I. & HARTMANN, L. (1996). Anaerobic digestion of total raw olive-oil wastewater in a two-stage pilot-plant (up-flow and fixed-bed bioreactors). *Bioresource Technology*, 57, 237-243.
- DAREIOTI, M. A. & KORNAROS, M. (2014). Effect of hydraulic retention time (HRT) on the anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes in a two-stage CSTR system. *Bioresource Technology*, 167, 407-415.
- DAVILA-VAZQUEZ, G.; ALATRISTE-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, 4989-4997.
- DAVILA-VAZQUEZ, G.; COTA-NAVARRO, C. B.; ROSALES-COLUNGA, L. M.; DE LEON-RODRIGUEZ, A. & RAZO-FLORES, E. (2009). Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 4296-4304.

- DE SÁ, L.; DE OLIVEIRA, T.; DOS SANTOS, T.; MATOS, A.; CAMMAROTA, M.; OLIVEIRA, E. & FERREIRA-LEITÃO, V. (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, 7543-7549.
- DE VRIEZE, J.; HENNEBEL, T.; BOON, N. & VERSTRAETE, W. (2012). Methanosarcina: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource Technology*, 112, 1-9.
- DE VRIEZE, J.; RAPORT, L.; WILLEMS, B.; VERBRUGGE, S.; VOLCKE, E.; MEERS, E.; ANGENENT, L. T. & BOON, N. (2015). Inoculum selection influences the biochemical methane potential of agro-industrial substrates. *Microbial Biotechnology*, 8, 776-786.
- DE ZEEUW, W. J. (1984). *Acclimatization of anaerobic sludge for UASB-reactor start-up*. sn].
- DEMIREL, B. & YENIGUN, O. (2006). Changes in microbial ecology in an anaerobic reactor. *Bioresour Technol*, 97, 1201-8.
- DINAMARCA, C.; GANAN, M.; LIU, J. & BAKKE, R. (2011). H₂ consumption by anaerobic non-methanogenic mixed cultures. *Water Sci Technol*, 63, 1582-9.
- DRAKE, H.; KÜSEL, K. & MATTHIES, C. (2002). Ecological consequences of the phylogenetic and physiological diversities of acetogen. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 203-213.
- ESCUDIÉ, R.; CRESSON, R.; DELGENÈS, J.-P. & BERNET, N. (2011). Control of start-up and operation of anaerobic biofilm reactors: An overview of 15 years of research. *Water Research*, 45, 1-10.
- ESPAÑA-GAMBOA, E.; DOMÍNGUEZ-MALDONADO, J. A.; TAPIA-TUSSELL, R.; CHALECANUL, J. S. & ALZATE-GAVIRIA, L. (2018). Corn industrial wastewater (nejayote): a promising substrate in Mexico for methane production in a coupled system (APCR-UASB). *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 712-722.
- FANG, H. H. & LIU, H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresour Technol*, 82, 87-93.
- FANG, H. H. & YU, H. (2000). Effect of HRT on mesophilic acidogenesis of dairy wastewater. *Journal of environmental engineering*, 126, 1145-1148.
- FERRAZ, F. M.; BRUNI, A. T. & DEL BIANCHI, V. L. (2009). Performance of an Anaerobic Baffled Reactor (ABR) in treatment of cassava wastewater. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 48-53.
- FERRER, I.; VÁZQUEZ, F. & FONT, X. (2010). Long term operation of a thermophilic anaerobic reactor: Process stability and efficiency at decreasing sludge retention time. *Bioresource Technology*, 101, 2972-2980.
- FERRER, Y. & PÉREZ, H. (2010). Los microorganismos en la digestión anaerobia y la producción de biogás. Consideraciones en la elección del inóculo para el mejoramiento de la calidad y el rendimiento. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 43.
- FONTES, D. & ZAIAT, M. (2012). The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 9630-9635.
- FOX, P.; SUIDAN, M. T. & BANDY, J. T. (1990). A comparison of media types in acetate fed expanded-bed anaerobic reactors. *Water Research*, 24, 827-835.
- FRANKE-WHITTLE, I. H.; WALTER, A.; EBNER, C. & INSAM, H. (2014). Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. *Waste Management*, 34, 2080-2089.
- FU, S.-F.; XU, X.-H.; DAI, M.; YUAN, X.-Z. & GUO, R.-B. (2017). Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. *Process Safety and Environmental Protection*, 107, 81-86.

- FUESS, L. T.; KIYUNA, L. S. M.; FERRAZ, A. D. N.; PERSINOTI, G. F.; SQUINA, F. M.; GARCIA, M. L. & ZAIAT, M. (2017). Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. *Applied Energy*, 189, 480-491.
- FUESS, L. T.; KLEIN, B. C.; CHAGAS, M. F.; ALVES FERREIRA REZENDE, M. C.; GARCIA, M. L.; BONOMI, A. & ZAIAT, M. (2018). Diversifying the technological strategies for recovering bioenergy from the two-phase anaerobic digestion of sugarcane vinasse: An integrated technoeconomic and environmental approach. *Renewable Energy*, 122, 674-687.
- GANESH, R.; RAJINIKANTH, R.; THANIKAL, J. V.; RAMANUJAM, R. A. & TORRIJOS, M. (2010). Anaerobic treatment of winery wastewater in fixed bed reactors. *Bioprocess and biosystems engineering*, 33, 619-628.
- GANGAGNI RAO, A.; VENKATA NAIDU, G.; KRISHNA PRASAD, K.; CHANDRASEKHAR RAO, N.; VENKATA MOHAN, S.; JETTY, A. & SARMA, P. N. (2005). Anaerobic treatment of wastewater with high suspended solids from a bulk drug industry using fixed film reactor (AFFR). *Bioresource Technology*, 96, 87-93.
- GARCIA, M. L.; LAPA, K. R.; FORESTI, E. & ZAIAT, M. (2008). Effects of bed materials on the performance of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor treating domestic sewage. *Journal of Environmental Management*, 88, 1471-1477.
- GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V. & AHRING, B. K. (2006). Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 1164-1175.
- GIJZEN, H. J.; BERNAL, E. & FERRER, H. (2000). Cyanide toxicity and cyanide degradation in anaerobic wastewater treatment. *Water Research*, 34, 2447-2454.
- GOMES, S. D.; FUESS, L. T.; MAÑUNGA, T.; FEITOSA DE LIMA GOMES, P. C. & 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, 8120-8131.
- GOMES, S. D.; FUESS, L. T.; PENTEADO, E. D.; LUCAS, S. D. M.; GOTARDO, J. T. & ZAIAT, M. (2015b). The application of an innovative continuous multiple tube reactor as a strategy to control the specific organic loading rate for biohydrogen production by dark fermentation. *Bioresource Technology*, 197, 201-207.
- GOSWAMI, R.; CHATTOPADHYAY, P.; SHOME, A.; BANERJEE, S. N.; CHAKRABORTY, A. K.; MATHEW, A. K. & CHAUDHURY, S. (2016). An overview of physico-chemical mechanisms of biogas production by microbial communities: a step towards sustainable waste management. *3 Biotech*, 6, 72.
- GOTTRET, M. V.; HENRY, G. & DUFOUR, D. (1997). Caracterización de la agroindustria de procesamiento de almidón agrio en el departamento del Cauca, Colombia. *Proyecto de Desarrollo de Agroempresas Rurales, CIAT*.
- GRAUSE, G.; IGARASHI, M.; KAMEDA, T. & YOSHIOKA, T. (2012). Lactic acid as a substrate for fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 16967-16973.
- GRIMMLER, C.; JANSSEN, H.; KRAUBE, D.; FISCHER, R.; BAHL, H.; DÜRRE, P.; LIEBL, W. & EHRENREICH, A. (2011). Genome-wide gene expression analysis of the switch between acidogenesis and solventogenesis in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 20, 1-15.

- GUARDIA PUEBLA, Y.; RODRÍGUEZ PÉREZ, S.; CUSCÓ VARONA, Y.; JIMÉNEZ HERNÁNDEZ, J. & SÁNCHEZ GIRÓN, V. (2014). Two-phase anaerobic digestion of coffee wet wastewater: Effect of recycle on anaerobic process performance. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 23.
- GUJER, W. & ZEHNDER, A. J. (1983). Conversion processes in anaerobic digestion. *Water science and technology*, 15, 127-167.
- GÜNGÖR-DEMIRCI, G. & DEMIRER, G. N. (2004). Effect of initial COD concentration, nutrient addition, temperature and microbial acclimation on anaerobic treatability of broiler and cattle manure. *Bioresource Technology*, 93, 109-117.
- HABOUZIT, F.; GÉVAUDAN, G.; HAMELIN, J.; STEYER, J.-P. & BERNET, N. (2011). Influence of support material properties on the potential selection of Archaea during initial adhesion of a methanogenic consortium. *Bioresource Technology*, 102, 4054-4060.
- HAFEZ, H.; NAKHLA, G. & EL NAGGAR, H. (2010a). An integrated system for hydrogen and methane production during landfill leachate treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 5010-5014.
- HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; NAGGAR, M. H. E.; ELBESHBISHY, E. & BAGHCHEHSARAEI, B. (2010b). Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *International journal of hydrogen energy*, 35, 81-92.
- HALLENBECK, P. & BENEMANN, J. (2002). Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1185-1193.
- HASAN, S. D.; GIONGO, C.; FIORESE, M. L.; GOMES, S. D.; FERRARI, T. C. & SAVOLDI, T. E. (2015). Volatile fatty acids production from anaerobic treatment of cassava waste water: effect of temperature and alkalinity. *Environ Technol*, 36, 2637-46.
- HASSAN, S. R.; ZWAIN, H. M.; ZAMAN, N. Q. & DAHLAN, I. (2014). Recycled paper mill effluent treatment in a modified anaerobic baffled reactor: start-up and steady-state performance. *Environmental Technology*, 35, 294-299.
- HAWKES, F.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. & HUSSY, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1339-1347.
- HEPPNER, B.; ZELLNER, G. & DIEKMANN, H. (1992). Start-up and operation of a propionate-degrading fluidized-bed reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 810-816.
- HERNANDEZ, D. M.; DEL PILAR HURTADO, L. A. & CHAPARRO, A. T. R. (2018). Hydrogen production in a novel configuration of UASB reactor under different hydraulic retention time. *DYNA*, 85, 157-162.
- HICKEY, R. F.; WU, W.-M.; VEIGA, M. & JONES, R. (1991). Start-up, operation, monitoring and control of high-rate anaerobic treatment systems. *Water Science and Technology*, 24, 207-255.
- HORIUCHI, J.-I.; SHIMIZU, T.; TADA, K.; KANNO, T. & KOBAYASHI, M. (2002). Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control. *Bioresource Technology*, 82, 209-213.
- HOUBRON, E.; ALVARADO-LASSMAN, A.; ZEPEDA, A. & RUSTRIAN, E. (2012). Methane yield and microscopic observation as monitoring biofilm behaviour parameters, during start up phase of anaerobic inverse fluidized bed reactor. *African Journal of Biotechnology*, 11, 14392-14398.
- HU, B. & CHEN, S. (2007). Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 3266-3273.

- HUANG, J. & PINDER, K. (1995). Effects of calcium on development of anaerobic acidogenic biofilms. *Biotechnology and bioengineering*, 45, 212-218.
- INCE, O. (1998). Performance of a two-phase anaerobic digestion system when treating dairy wastewater. *Water Research*, 32, 2707-2713.
- INFANTES, D.; GONZÁLEZ, A.; VILLASEÑOR, J. & FERNÁNDEZ, F. (2011). Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 15595-15601.
- INTANOO, P.; CHAIMONGKOL, P. & CHAVADEJ, S. (2016). Hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactors (UASB) with an emphasis on maximum hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 6107-6114.
- INTANOO, P.; RANGSANVIGIT, P.; MALAKUL, P. & CHAVADEJ, S. (2014). Optimization of separate hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) system under thermophilic operation. *Bioresource Technology*, 173, 256-265.
- JANKE, L.; LEITE, A. F.; BATISTA, K.; SILVA, W.; NIKOLAUSZ, M.; NELLES, M. & STINNER, W. (2016). Enhancing biogas production from vinasse in sugarcane biorefineries: Effects of urea and trace elements supplementation on process performance and stability. *Bioresource Technology*, 217, 10-20.
- JÁUREGUI-JÁUREGUI, J. A.; MÉNDEZ-ACOSTA, H. O.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, V.; SNELL-CASTRO, R.; ALCARAZ-GONZÁLEZ, V. & GODON, J. J. (2014). Anaerobic treatment of tequila vinasses under seasonal operating conditions: Start-up, normal operation and restart-up after a long stop and starvation period. *Bioresource Technology*, 168, 33-40.
- JENKINS, S.; MORGAN, J. & SAWYER, C. (1983). Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 448-453.
- JIANG, H. Y.; QIN, Y.; GADOW, S. I. & LI, Y. Y. (2017). The performance and kinetic characterization of the three metabolic reactions in the thermophilic hydrogen and acidic fermentation of cassava residue. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 2868-2877.
- JIRAPRASERTWONG, A.; MAITRIWONG, K. & CHAVADEJ, S. (2019). Production of biogas from cassava wastewater using a three-stage upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Renewable Energy*, 130, 191-205.
- JUNG, K.; KIM, D.; KIM, S. & SHIN, H. (2011a). Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresour Technol*, 102, 8612-20.
- JUNG, K.; KIM, D.; KIM, S. & SHIN, H. (2011b). Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresource technology*, 102, 8612-20.
- KAN, E. (2012). Effects of pretreatments of anaerobic sludge and culture conditions on hydrogen productivity in dark anaerobic fermentation. *Renewable Energy*, 49, 227-231.
- KANNAIAH, R.; SARKAR, O. & VENKATA, S. (2013). Regulation of biohydrogen production by heat-shock pretreatment facilitates selective enrichment of *Clostridium* sp. *International Journal of Hydrogen Energy*.
- KE, S.; SHI, Z. & FANG, H. H. (2005). Applications of two-phase anaerobic degradation in industrial wastewater treatment. *International Journal of Environment and Pollution*, 23, 65-80.
- KHANAL, S. (2003). Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 1123-1131.

- KIM, S.; CHOI, K.; KIM, J.-O. & CHUNG, J. (2013). Biological hydrogen production by anaerobic digestion of food waste and sewage sludge treated using various pretreatment technologies. *Biodegradation*, 1-12.
- KONGJAN, P.; JARIYABOON, R. & O-THONG, S. (2014). Anaerobic digestion of skim latex serum (SLS) for hydrogen and methane production using a two-stage process in a series of up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, 19343-19348.
- KYAZZE, G.; DINSDALE, R.; GUWY, A. J.; HAWKES, F. R.; PREMIER, G. C. & HAWKES, D. L. (2007). Performance characteristics of a two-stage dark fermentative system producing hydrogen and methane continuously. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 759-770.
- LABATUT, R. A.; ANGENENT, L. T. & SCOTT, N. R. (2011). Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates. *Bioresour Technol*, 102, 2255-64.
- LAHAV, O. & MORGAN, B. (2004). Titration methodologies for monitoring of anaerobic digestion in developing countries—a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, 1331-1341.
- LAMAISON, F.; FRAGATA, R.; ANTÔNIO, R.; AMANTE, E. & REGINATTO, V. (2014). Pretreatment on anaerobic sludge for enhancement of biohydrogen production from cassava processing wastewater. Disponible en: <http://www.periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/view/17736>. *Acta Scientiarum. Technology*, 36, 437-444.
- LAZARO, C. Z.; BOSIO, M.; DOS SANTOS FERREIRA, J.; VARESCHE, M. B. A. & SILVA, E. L. (2015). The biological hydrogen production potential of agroindustrial residues. *Waste and Biomass Valorization*, 6, 273-280.
- LEAÑO, E. P. & BABEL, S. (2012). Effects of pretreatment methods on cassava wastewater for biohydrogen production optimization. *Renewable Energy*, 39, 339-346.
- LEMA, J.; MÉNDEZ, R.; IZA, J.; GARCIA, P. & FERNÁNDEZ-POLANCO, F. (1991). Chemical reactor engineering concepts in design and operation of anaerobic treatment processes. *Water Science and Technology*, 24, 79-86.
- LEVIN, D.; PITT, L. & LOVE, M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 173-185.
- LI, C. & FANG, H. (2007). Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37, 1-39.
- LIN, C. & CHANG, R. (2004). Fermentative hydrogen production at ambient temperature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 715-720.
- LIU, D.; LIU, D.; ZENG, R. J. & ANGELIDAKI, I. (2006). Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process. *Water Research*, 40, 2230-2236.
- LIU, Y. (1996). Bioenergetic interpretation on the S₀X₀ ratio in substrate-sufficient batch culture. *Water Research*, 30, 2766-2770.
- LOGAN, B.; OH, S.; KIM, I. & VAN GINKEL, S. (2002). Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environmental science & technology*, 36, 2530-2535.
- LU, X.; WANG, H.; MA, F.; ZHAO, G. & WANG, S. (2018). Improved process performance of the acidification phase in a two-stage anaerobic digestion of complex organic waste: Effects of an iron oxide-zeolite additive. *Bioresource Technology*, 262, 169-176.

- LUCAS, S. D. M.; PEIXOTO, G.; MOCKAITIS, G.; ZAIAT, M. & GOMES, S. D. (2015). Energy recovery from agro-industrial wastewaters through biohydrogen production: Kinetic evaluation and technological feasibility. *Renewable Energy*, 75, 496-504.
- 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.
- MAINTINGUER, S.; FERNANDES, B.; DUARTE, I.; SAAVEDRA, N.; ADORNO, M. & VARESCHE, M. (2008). Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4309-4317.
- MAMATARKOVA, V.; NIKOLOV, L. & KARAMANOV, D. (2002). Biofilms: problems and trends in research activity. Part I: biofilm carriers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 16, 170-176.
- MARTÍN-GONZÁLEZ, L.; FONT, X. & VICENT, T. (2013). Alkalinity ratios to identify process imbalances in anaerobic digesters treating source-sorted organic fraction of municipal wastes. *Biochemical Engineering Journal*, 76, 1-5.
- MASSANET-NICOLAU, J.; DINSDALE, R.; GUWY, A. & SHIPLEY, G. (2013). Use of real time gas production data for more accurate comparison of continuous single-stage and two-stage fermentation. *Bioresour Technol*, 129, 561-7.
- MASSET, J.; HILIGSMANN, S.; HAMILTON, C.; BECKERS, L.; FRANCK, F. & THONART, P. (2010). Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009. *International journal of hydrogen energy*, 35, 3371-3378.
- MICHAUD, S.; BERNET, N.; BUFFIÈRE, P.; ROUSTAN, M. & MOLETTA, R. (2002). Methane yield as a monitoring parameter for the start-up of anaerobic fixed film reactors. *Water Research*, 36, 1385-1391.
- MOHAN, S.; BABU, V. & SARMA, P. (2008a). Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresour Technology*, 99, 59-67.
- MOHAN, S.; MOHANAKRISHNA, G. & SARMA, P. (2008b). Integration of acidogenic and methanogenic processes for simultaneous production of biohydrogen and methane from wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 2156-2166.
- MOLINA, F.; RUIZ-FILIPPI, G.; GARCIA, C.; LEMA, J. M. & ROCA, E. (2009). Pilot-scale validation of a new sensor for on-line analysis of volatile fatty acids and alkalinity in anaerobic wastewater treatment plants. *Environmental Engineering Science*, 26, 641-649.
- MOSET, V.; AL-ZOHAIRI, N. & MØLLER, H. B. (2015). The impact of inoculum source, inoculum to substrate ratio and sample preservation on methane potential from different substrates. *Biomass and Bioenergy*, 83, 474-482.
- MOSEY, F. E. & FERNANDES, X. A. (1988). Patterns of hydrogen in biogas from the anaerobic digestion of milk-sugars. In: LIJKLEMA, L., IMHOFF, K. R., IVES, K. J., JENKINS, D., LUDWIG, R. G., SUZUKI, M., TOERIEN, D. F., WHEATLAND, A. B., MILBURN, A. & IZOD, E. J. (eds.) *Water Pollution Research and Control Brighton*. Pergamon.
- MOTA, V. T.; FERRAZ JUNIOR, A. D. N.; TRABLY, E. & ZAIAT, M. (2018). Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible? *Water Res*, 128, 350-361.

- NASR, N.; ELBESHBISHY, E.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G. & EL NAGGAR, M. H. (2011). Bio-hydrogen production from thin stillage using conventional and acclimatized anaerobic digester sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 12761-12769.
- NUALSRI, C.; KONGJAN, P. & REUNGSANG, A. (2016). Direct integration of CSTR-UASB reactors for two-stage hydrogen and methane production from sugarcane syrup. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 17884-17895.
- 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, 3409-3416.
- OBAZU, F. O.; NGOMA, L. & GRAY, V. M. (2012). Interrelationships between bioreactor volume, effluent recycle rate, temperature, pH, %H₂, hydrogen productivity and hydrogen yield with undefined bacterial cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 5579-5590.
- OECHSNER, H.-W.; LEMMER, A.; RAMHOLD, D.; MATHIES, E.; MAYRHUBER, E. & PREISLER, D. (2010). Method for producing biogas in controlled concentrations of trace elements. Google Patents.
- OH, S. & LOGAN, B. (2005). Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Research*, 39, 4673-4682.
- PAIXÃO, M. A.; TAVARES, C. R.; BERGAMASCO, R.; BONIFÁCIO, A. L. & COSTA, R. T. (Year) Published. Anaerobic digestion from residue of industrial cassava industrialization with acidogenic and methanogenic physical separation phases. Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2000. Springer, 809-819.
- PARRA-HUERTAS, R. A. (2015). Digestión anaeróbica: mecanismos biotecnológicos en el tratamiento de aguas residuales y su aplicación en la industria alimentaria. *Producción + Limpia*, 10, 142-159.
- PATÓN, M.; GONZÁLEZ-CABALEIRO, R. & RODRÍGUEZ, J. (2018). Activity corrections are required for accurate anaerobic digestion modelling. *Water Science and Technology*, 77, 2057-2067.
- PEIXOTO, G.; PANTOJA-FILHO, J. L.; AGNELLI, J. A.; BARBOZA, M. & ZAIAT, M. (2012). Hydrogen and methane production, energy recovery, and organic matter removal from effluents in a two-stage fermentative process. *Appl Biochem Biotechnol*, 168, 651-71.
- PENTEADO, E.; LAZARO, C.; SAKAMOTO, I. & ZAIAT, M. (2013). Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 6137-6145.
- PÉREZ, A. & TORRES, P. (2008). Indices de alcalinidad para el control del tratamiento anaerobio de aguas residuales fácilmente acidificables. *Revista Ingeniería y Competitividad*, 10, 41-52.
- PÉREZ, A.; TORRES, P. & PIZARRO, C. (2006). Arranque de un filtro anaerobio para el tratamiento de aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca: influencia del inóculo. *Ingeniería y Competitividad*, 8, 47-54.
- 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, 139-148.
- PEREZ, M.; ROMERO, L. I.; NEBOT, E. & SALES, D. (1997). Colonisation of a porous sintered-glass support in anaerobic thermophilic bioreactors. *Bioresource Technology*, 59, 177-183.
- PICANCO, A.; VALLERO, M.; GIANOTTI, E.; ZAIAT, M. & BLUNDI, C. (2001). Influence of porosity and composition of supports on the methanogenic biofilm characteristics developed in a fixed bed anaerobic reactor. *Water Science and Technology*, 44, 197-204.

- PINGMUANGLEK, P.; JAKRAWATANA, N. & GHEEWALA, S. H. (2017). Supply chain analysis for cassava starch production: Cleaner production opportunities and benefits. *Journal of Cleaner Production*, 162, 1075-1084.
- PIZARRO, M.; SANCHEZ, T.; CEBALLOS, H.; MORANTE, N. & DUFOUR, D. (2016). Diversificación de los Almidones de Yuca y sus Posibles Usos en la Industria Alimentaria. *Revista Politécnica*, 37, 1.
- POHLAND, F. G. & GHOSH, S. (1971). Developments in anaerobic stabilization of organic wastes--the two-phase concept. *Environ Lett*, 1, 255-66.
- RAJASIMMAN, M. & KARTHIKEYAN, C. (2007). Aerobic digestion of starch wastewater in a fluidized bed bioreactor with low density biomass support. *Journal of Hazardous Materials*, 143, 82-86.
- RAMÍREZ-MORALES, J. E.; TORRES ZÚÑIGA, I. & BUITRÓN, G. (2015). On-line heuristic optimization strategy to maximize the hydrogen production rate in a continuous stirred tank reactor. *Process Biochemistry*, 50, 893-900.
- RAMÓN, A. & MALDONADO, J. I. (2013). Sistema de tratamiento para aguas residuales industriales en mataderos. *Revista Ambiental Agua, Aire y Suelo*, 1.
- RAMOS, L. R. & SILVA, E. L. (2019). Thermophilic hydrogen and methane production from sugarcane stillage in two-stage anaerobic fluidized bed reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*.
- REDDY, K.; NASR, M.; KUMARI, S.; KUMAR, S.; GUPTA, S. K.; ENITAN, A. M. & BUX, F. (2017). Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate: effects of pH, S/X, Fe 2+, and magnetite nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 8790-8804.
- REGINATTO, V.; LAMAISON, F. D. C.; AMANTE, E. R. & ANTÔNIO, R. V. (2011). METHODS: Long-term effect of nutrient supplementation of cassava wastewater on biohydrogen production by mixed culture. *Industrial Biotechnology*, 7, 143-150.
- REN, N.-Q.; TANG, J.; LIU, B.-F. & GUO, W.-Q. (2010). Biological hydrogen production in continuous stirred tank reactor systems with suspended and attached microbial growth. *international journal of hydrogen energy*, 35, 2807-2813.
- REN, N.; GUO, W.; WANG, X.; XIANG, W.; LIU, B.; WANG, X.; DING, J. & CHEN, Z. (2008). Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4318-4324.
- REUNGSANG, A.; SITTIJUNDA, S. & SREELA-OR, C. (2016). Methane production from acidic effluent discharged after the hydrogen fermentation of sugarcane juice using batch fermentation and UASB reactor. *Renewable Energy*, 86, 1224-1231.
- RIPLEY, L.; BOYLE, W. & CONVERSE, J. (1986). Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 406-411.
- RITTMAN, B. & MCCARTY, P. (2001). Environmental biotechnology: principles and applications. McGraw-Hill. Inc., USA, 6-11.
- ROJAS-CHACÓN, O. (2004). Capacidad tampón en reactores anaerobios. Curso sobre tratamiento anaerobio de aguas residuales. Cali, Colombia: Universidad del Valle.
- ROJAS, O. (1999). Evaluación del comportamiento de tres sistemas de tratamiento anaerobio para la depuración de las aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca. *Cali, Colombia: Universidad del Valle, Posgrado en Ingeniería Sanitaria y Ambiental*.
- ROZZI, A. (1986). Parámetros de operación y control de los procesos anaerobios. *Tercer Seminario sobre depuración anaeróbica de aguas residuales, Valladolid, España*.

- RUBIO-LOZA, L. & NOYOLA, A. (2010). Two-phase (acidogenic–methanogenic) anaerobic thermophilic/mesophilic digestion system for producing Class A biosolids from municipal sludge. *Bioresource Technology*, 101, 576-585.
- SADDOUD, A. & SAYADI, S. (2007). Application of acidogenic fixed-bed reactor prior to anaerobic membrane bioreactor for sustainable slaughterhouse wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 149, 700-706.
- SANDBERG, M. & AHRING, B. K. (1992). Anaerobic treatment of fish meal process waste-water in a UASB reactor at high pH. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 800-804.
- SANDOVAL, N. (2002). Sistema agroalimentario localizado de producción de almidón agro de yuca en el departamento del Cauca–Colombia. *Centro Internacional de Agricultura Tropical, Palmira*, 14p.
- SARRIÁ, H. (2012b). *Contaminación y toxicidad de las aguas residuales de las rallanderías del Norte del Cauca, Colombia*. Doctor en Biología, Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
- SCHIEVANO, A.; TENCA, A.; SCAGLIA, B.; MERLINO, G.; RIZZI, A.; DAFFONCHIO, D.; OBERTI, R. & ADANI, F. (2012). Two-stage vs single-stage thermophilic anaerobic digestion: comparison of energy production and biodegradation efficiencies. *Environ Sci Technol*, 46, 8502-10.
- SCHMIDT, T.; ZIGANSHIN, A. M.; NIKOLAUSZ, M.; SCHOLWIN, F.; NELLES, M.; KLEINSTEUBER, S. & PRÖTER, J. (2014). Effects of the reduction of the hydraulic retention time to 1.5 days at constant organic loading in CSTR, ASBR, and fixed-bed reactors – Performance and methanogenic community composition. *Biomass and Bioenergy*, 69, 241-248.
- SHOW, K.-Y.; WANG, Y.; FOONG, S.-F. & TAY, J.-H. (2004). Accelerated start-up and enhanced granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Water Research*, 38, 2293-2304.
- SINGH, S. & PRERNA, P. (2009). Review of recent advances in anaerobic packed-bed biogas reactors. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, 1569-1575.
- SINGHANIA, R.; PATEL, A.; CHRISTOPHE, G.; FONTANILLE, P. & LARROCHE, C. (2012). Biological upgrading of volatile fatty acids, key intermediates for the valorization of biowaste through dark anaerobic fermentation. *Bioresource Technology*.
- SOBECK, D. C. & HIGGINS, M. J. (2002). Examination of three theories for mechanisms of cation-induced bioflocculation. *Water research*, 36, 527-538.
- SOLERA, R.; ROMERO, L. & SALES, D. (2002). The evolution of biomass in a two-phase anaerobic treatment process during start-up. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 16, 25-30.
- SPEECE, R. E. (1983). Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environmental science & technology*, 17, 416A-427A.
- SPEECE, R. E. (1996). Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*.
- SREETHAWONG, T.; CHATSIRIWATANA, S.; RANGSUNVIGIT, P. & CHAVADEJ, S. (2010). Hydrogen production from cassava wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor: Effects of operational parameters, COD:N ratio, and organic acid composition. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 4092-4102.
- SRIKANTH, S.; MOHAN, S.; DEVI, M.; PERI, D. & SARMA, P. (2009). Acetate and butyrate as substrates for hydrogen production through photo-fermentation: Process optimization and combined performance evaluation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7513-7522.

- SRIKANTH, S.; VENKATA, S.; LALIT, V. & SARMA, P. (2010). Metabolic shift and electron discharge pattern of anaerobic consortia as a function of pretreatment method applied during fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 10693-10700.
- SRIROTH, K.; PIYACHOMKWAN, K.; WANLAPATIT, S. & OATES, C. G. (2000). Cassava starch technology: the Thai experience. *Starch-Stärke*, 52, 439-449.
- SU, C.; LU, Y.; QIN, J.; ZHENG, P.; QIU, R.; CHEN, M.; VAHALA, R. & WANG, Y. (2017). Performance and microbial community structure characterization of a CIC anaerobic reactor for the treatment of cassava wastewater. *Ecological Engineering*, 108, 114-122.
- SU, H.; CHENG, J.; ZHOU, J.; SONG, W. & CEN, K. (2009). Improving hydrogen production from cassava starch by combination of dark and photo fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 1780-1786.
- SUN, L.; WAN, S.; YU, Z.; WANG, Y. & WANG, S. (2012). Anaerobic biological treatment of high strength cassava starch wastewater in a new type up-flow multistage anaerobic reactor. *Bioresource Technology*, 104, 280-8.
- TALARPOSHTI, A. M.; DONNELLY, T. & ANDERSON, G. K. (2001). Colour removal from a simulated dye wastewater using a two-phase Anaerobic packed bed reactor. *Water Research*, 35, 425-432.
- TERREROS-MECALCO, J.; OLMOS-DICHARA, A.; NOYOLA-ROBLES, A.; RAMÍREZ-VIVES, F. & MONROY-HERMOSILLO, O. (2009). Digestión anaerobia de lodo primario y secundario en dos reactores UASB en serie. *Revista mexicana de ingeniería química*, 8, 153-161.
- TIEN, H. M.; LE, K. A. & LE, P. T. K. (2017). Bio hydrogen production from cassava starch by anaerobic mixed cultures: Multivariate statistical modeling. *AIP Conference Proceedings*, 1878, 020039.
- TORKIAN, A.; EQBALI, A. & HASHEMIAN, S. J. (2003). The effect of organic loading rate on the performance of UASB reactor treating slaughterhouse effluent. *Resources, Conservation and Recycling*, 40, 1-11.
- TORRES, D. G. B.; LUCAS, S. D. M.; ANDREANI, C. L.; CARVALHO, K. Q. D.; 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, 160-172.
- TORRES, P.; CAJIGAS, A. & PÉREZ, A. (2005a). Importancia del pH y la alcalinidad en el tratamiento anaerobio de las aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca. *Ciencias*.
- TORRES, P.; PEREZ, A.; CAJIGAS, Á.; OTERO, A. & GONZÁLEZ, M. (2008). Selection of chemical conditioners for cassava wastewater anaerobic treatment (in Spanish: Selección de acondicionadores químicos para el tratamiento anaerobio de aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca). *Ingeniería de recursos naturales y del ambiente*, 66-74.
- TORRES, P.; PEREZ, A.; MARMOLEJO, L.; ORDÓÑEZ, J. & GARCIA, R. (2010). A look at the agro-industry of cassava starch extraction since processes standardization (in Spanish: Una mirada a la agroindustria de extracción de almidón de yuca, desde la estandarización de procesos). *Revista EIA, Escuela de Ingeniería de Antioquia, Medellín (Colombia)*, 14, 23-38.
- TORRES, P.; RODRÍGUEZ, J. & ROJAS, O. (2005b). Extracción de almidón de yuca. Manejo integral y control de la contaminación hídrica. *CIPAV Livestock Research for Rural Development*, 17.
- TORRES, P.; RODRIGUEZ, J. & URIBE, I. E. (2003). Tratamiento de aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca en filtro anaerobio: influencia del medio de soporte. *Scientia et Technica*, 3.
- TRAN, T.; DA, G.; MORENO-SANTANDER, M. A.; VÉLEZ-HERNÁNDEZ, G. A.; GIRALDO-TORO, A.; PIYACHOMKWAN, K.; SRIROTH, K. & DUFOUR, D. (2015). A comparison of energy use,

- water use and carbon footprint of cassava starch production in Thailand, Vietnam and Colombia. *Resources, conservation and recycling*, 100, 31-40.
- TRITT, W. P. & KANG, H. (2017). Slaughterhouse wastewater treatment in a bamboo ring anaerobic fixed-bed reactor. *Environmental Engineering Research*, 23, 70-75.
- VALDEZ, I. & POGGI, H. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, 1000-1013.
- VAN HAANDEL, A. C. (1994). Influence of the digested COD concentration on the alkalinity requirement in anaerobic digesters. *Water Science and Technology*, 30, 23-34.
- VAN LIER, J. B.; VAN DER ZEE, F. P.; FRIJTERS, C. T. M. J. & ERSAHIN, M. E. (2015). Celebrating 40 years anaerobic sludge bed reactors for industrial wastewater treatment. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14, 681-702.
- VARGAS-AGUILAR, P. & HERNÁNDEZ-VILLALOBOS, D. (2013). Harinas y almidones de yuca, ñame, camote y ñampí: propiedades funcionales y posibles aplicaciones en la industria alimentaria. *Revista Tecnología en Marcha*, 26, 37-45.
- VENDRUSCOLO, F. (2015). Starch: a potential substrate for biohydrogen production. *International journal of energy research*, 39, 293-302.
- VENETSANEAS, N.; ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; KORNAROS, M. & LYBERATOS, G. (2009). Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresource Technology*, 100, 3713-3717.
- VOLPINI, V.; LOVATO, G.; ALBANEZ, R.; RATUSZNEI, S. M. & RODRIGUES, J. A. D. (2018). Biomethane generation in an AnSBBR treating effluent from the biohydrogen production from vinasse: Optimization, metabolic pathways modeling and scale-up estimation. *Renewable Energy*, 116, 288-298.
- VON SPERLING, M. & CHERNICHARO, C. (2005). *Biological wastewater treatment in warm climate regions*, IWA.
- WANG, B.; BJÖRN, A.; STRÖMBERG, S.; NGES, I. A.; NISTOR, M. & LIU, J. (2017a). Evaluating the influences of mixing strategies on the Biochemical Methane Potential test. *Journal of Environmental Management*, 185, 54-59.
- WANG, B.; WAN, W. & WANG, J. (2008). Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 7013-7019.
- WANG, J. & WAN, W. (2008). Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *International journal of hydrogen energy*, 33, 2934-2941.
- WANG, J. & WAN, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International journal of hydrogen energy*, 34, 799-811.
- WARD, A. J.; HOBBS, P. J.; HOLLIMAN, P. J. & JONES, D. L. (2008). Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*, 99, 7928-7940.
- WEEDERMANN, M.; SEO, G. & WOLKOWICZ, G. (2013). Mathematical model of anaerobic digestion in a chemostat: effects of syntrophy and inhibition. *Journal of Biological Dynamics*, 7, 59-85.
- WEILAND, P. & ROZZI, A. (1991). The start-up, operation and monitoring of high-rate anaerobic treatment systems: discussor's report. *Water Science and Technology*, 24, 257-277.
- WU, X.; YANG, H. & GUO, L. (2010). Effect of operation parameters on anaerobic fermentation using cow dung as a source of microorganisms. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 46-51.

- XIAO, B. & LIU, J. (2006). Effects of thermally pretreated temperature on bio-hydrogen production from sewage sludge. *Journal of Environmental Sciences*, 18, 6-12.
- YANG, P.; ZHANG, R.; MCGARVEY, J. A. & BENEMANN, J. R. (2007). Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 4761-4771.
- YOUNG, J. C. & MCCARTY, P. L. (1969). The anaerobic filter for waste treatment. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, R160-R173.
- YUAN, Z.; YANG, H.; ZHI, X. & SHEN, J. (2010). Increased performance of continuous stirred tank reactor with calcium supplementation. *international journal of hydrogen energy*, 35, 2622-2626.
- ZHAO, Z.; ZHANG, Y.; CHEN, S.; QUAN, X. & YU, Q. (2014). Bioelectrochemical enhancement of anaerobic methanogenesis for high organic load rate wastewater treatment in a up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Scientific reports*, 4, 6658.
- ZOETEMEYER, R. J.; ARNOLDY, P.; COHEN, A. & BOELHOUWER, C. (1982). Influence of temperature on the anaerobic acidification of glucose in a mixed culture forming part of a two-stage digestion process. *Water Research*, 16, 313-321.
- ZWAIN, H. M.; HASSAN, S. R.; ZAMAN, N. Q.; AZIZ, H. A. & DAHLAN, I. (2013). The start-up performance of modified anaerobic baffled reactor (MABR) for the treatment of recycled paper mill wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 1, 61-64.

Capítulo 2 Objetivos de la investigación

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar condiciones operacionales para el acople entre un reactor anaerobio de medio suspendido y un reactor anaerobio de crecimiento adherido para la producción de hidrógeno y metano a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la influencia del pretratamiento del inóculo, pH inicial y la relación sustrato: biomasa en la producción biológica de hidrógeno.
2. Evaluar la influencia de la COVe sobre el HY a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca en condiciones de flujo continuo
3. Investigar el uso del efluente de un reactor acidogénico para la producción de metano a través del acople entre un reactor acidogénico (RA) y un reactor metanogénico (RM) simulando un proceso de DA en dos fases, con énfasis en el periodo de arranque del RM

Capítulo 3 Influencia del pretratamiento del inóculo, pH inicial y relación sustrato/biomasa sobre la producción fermentativa de hidrógeno

En este capítulo se evalúa la influencia del pretratamiento del inóculo, pH inicial y relación sustrato/biomasa sobre la producción fermentativa de hidrógeno. Estos tres factores ambientales han sido identificados en diversas investigaciones como variables de interés en la fermentación oscura en un rango bastante amplio de variación. Con el propósito de identificar en menor tiempo y con menores recursos, los rangos de variación o la zona de optimización de estas variables para el caso particular de esta investigación, se realizaron estudios a escala de laboratorio y en “batch” o flujo discontinuo.

La revisión de literatura permitió identificar que, con inóculos mixtos los pretratamientos más utilizados son químico y térmico. Además, estos pretratamientos podrían ser aplicados en procesos a mayor escala. Con relación al pH inicial, se reporta que un valor adecuado para la producción fermentativa de hidrógeno podría escogerse entre 5,0 y 6,0, por lo que se escogieron tres valores en este intervalo para evaluar su influencia sobre la producción fermentativa de hidrógeno. Adicionalmente, debido a que el agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca es un residuo parcialmente acidificado con pH entre 3,6 y 6,5, se evaluó si la producción de hidrógeno a partir de este sustrato puede llevarse a cabo sin la modificación del pH del agua residual (adición de un alcalinizante), una vez que esta condición podría proporcionar unas condiciones iniciales en el rango ácido. Finalmente, la influencia de la relación sustrato/biomasa denominada en este estudio relación S/X, sobre la producción fermentativa de hidrógeno se evaluó a través de tres valores que fueron seleccionados dentro de un rango entre 2 y 10 g DQO.g⁻¹ SV debido a que la revisión de literatura permitió identificar que en ese intervalo se presenta la mayor reducción de carbohidratos y mayor rendimiento de hidrógeno, cuando se utiliza como inóculo un lodo anaerobio aclimatado.

Por lo anterior, el objetivo de este capítulo es evaluar la influencia del pretratamiento del inóculo, pH inicial y la relación sustrato: biomasa en la producción biológica de hidrógeno, para tal fin el documento está dividido en Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Recomendaciones y Bibliografía. En los materiales y métodos se detalla todo el procedimiento experimental utilizado, la forma de recolección y el procesamiento de los datos, así como el análisis estadístico. Los resultados y análisis se presentan en orden; primero se discute sobre el experimento E1 y luego sobre el E2; los resultados se presentan a través de graficas de barras y tablas. Finalmente, se presentan las conclusiones en el mismo orden y se entregan algunas recomendaciones para estudios futuros.

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Biotecnología Ambiental, adscrito al área de Ingeniería Sanitaria y Ambiental de la Universidad del Valle (Cali, Colombia). Se realizaron dos experimentos denominados E1 y E2. En el primer experimento (E1) se evaluó el efecto combinado del pretratamiento del inóculo y pH inicial sobre la producción fermentativa de H₂ y en el segundo (E2), se evaluó el efecto de la relación S/X sobre el rendimiento de hidrógeno. Para el segundo experimento se seleccionaron tanto el pretratamiento térmico y el pH inicial de 5,2 ± 0,2, debido a que bajo estas dos condiciones iniciales se observaron los mejores rendimientos de hidrógeno (HY) durante el experimento E1. En los dos experimentos se utilizó como sustrato principal agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca (S2). Adicionalmente, en el segundo experimento se incluyó un agua residual sintética (S1)

preparada a base de sacarosa que fue usada como un control de referencia que eliminara la interferencia del sustrato sobre los resultados. Aunque los experimentos no se realizaron paralelamente, el inóculo utilizado tenía la misma procedencia.

3.1.1 SUSTRATO

El sustrato S1 fue preparado a partir de sacarosa con una DQO de $5,8 \text{ g.L}^{-1}$ y Carbohidratos Totales (CH) de $3,9 \text{ g.L}^{-1}$ y suplementado con macronutrientes (N-NH_4^+ , P-PO_4^{3-} , Mg, Ca) y micronutrientes (Fe, Ni, Zn, Co) utilizando una solución previamente descrita por [Del Nery \(1987\)](#) y [Torres y Pérez \(2010\)](#). El sustrato S2 fue agua residual del proceso de extracción de almidón agrio de yuca que, aunque fue preparado en el laboratorio, corresponde a un agua residual real. Para la obtención de S2 se aplicó un método semejante al que ocurre en las rallanderías ubicadas al norte del departamento del Cauca (Colombia), en el cual el proceso es semi-mecanizado, y consta de *lavado-pelado-rallado-sedimentación*. El proceso inició con el lavado de las raíces de yuca, para retirar el material particulado proveniente del cultivo y el retiro la corteza externa secundaria (cascarilla). Las raíces se rallaron manualmente en un rallador causando el rompimiento celular para liberar el almidón. La masa de yuca rallada se mezcló con agua potable y la mezcla se dispuso en un tamiz fino para retirar la fibra del almidón. La lechada de almidón se mantuvo en reposo a temperatura ambiente durante 17 h, para sedimentar el almidón y obtener un sobrenadante que correspondía al agua residual, la cual era recolectada y almacenada bajo refrigeración (4°C) hasta su uso ($< 24\text{h}$). En la Figura 3.1 se esquematiza el proceso de elaboración del sustrato S2.



Figura 3.1 Esquema de preparación del sustrato S2

Las principales características fisicoquímicas del sustrato S2 se presentan en la Tabla 3.1, las cuales fueron semejantes al agua residual derivada de las rallanderías ubicadas al norte del Departamento del Cauca (Colombia) ([Colin et al., 2007](#)). La diferencia principal entre el AR utilizada en el E1 y E2 se observa en la concentración de carbohidratos totales (CH), los cuales fueron incrementados para la realización del experimento E2. [Gomes et al. \(2016\)](#), [Rosa et al. \(2016\)](#), [Torres et al. \(2017\)](#) han reportado concentraciones de CH similares en efluentes de procedencia semejante.

Tabla 3.1 Características fisicoquímicas el sustrato S2 para los experimentos E1 y E2

Parámetro fisicoquímico	Unidades	En este estudio		Colin <i>et al.</i> (2007)	Métodos analíticos
		E1	E2	Rango ⁽¹⁾	
pH	-	3,72	4,82	3,6 – 6,5	APHA <i>et al.</i> (2005)
Nitrógeno Amoniacal Total (NAT)	mg N-NH ₃ .L ⁻¹	19	40	80 - 150	
Orto-Fosfato	mg PO ₄ ⁻³ .L ⁻¹	7,79	34	20 - 35	
SST	mg.L ⁻¹	236	725	700 -2.000	
DQO (total)	mg.L ⁻¹	2.671	5.754	4.200 – 7.000	
DQO (filtrada)	mg.L ⁻¹	2.094	4.128	3.500 – 6.100	
Alcalinidad Total (AT)	mg CaCO ₃ .L ⁻¹	0	221	-	Adaptando el método descrito por DiLallo y Albertson (1961)
Alcalinidad Bicarbonática (AB)		0	0	-	
Ácidos grasos volátiles totales (AGV)	mg Acético.L ⁻¹	2.042	885	-	DuBois <i>et al.</i> (1956)
Carbohidratos totales	mg CH.L ⁻¹	491	1.328	330 - 400	

⁽¹⁾ Principales características del agua residual de extracción de almidón de yuca tomadas de 12 rallanderías ubicadas al norte del departamento del Cauca (Colombia)

3.1.2 INÓCULO Y ACLIMATACIÓN

El inóculo utilizado corresponde a un lodo anaerobio mixto recolectado de un reactor UASB, de la planta de tratamiento de agua residual del centro de sacrificio de ganado de la Central de Abastecimiento del Valle del Cauca (CAVASA), ubicada en el kilómetro 11 en la vía Cali – Candelaria. Este inóculo fue seleccionado en virtud de sus características físicas y microbiológicas, su sedimentabilidad es superior (24 m.h⁻¹) frente a lodos de PTAR doméstica también disponibles en la región (1,5 m. h⁻¹), por lo que presenta una mejor tendencia a formación de gránulos y adicionalmente, exhibe una diversidad microbiológica anaerobia mejor balanceada (Ramírez, 1998), lo cual permite que frente a diferentes sustratos como acetato, butirato y mezcla de H₂ y CO₂ genere valores de AME de 0,57, 0,37 y 0,15 g DQO-CH₄.g⁻¹.SVT.d⁻¹ respectivamente, suficientes para catalogarlo como un inóculo adecuado para la DA (Guyot *et al.*, 1993, Ramírez, 1998). La viabilidad de este inóculo para su aplicación en la producción fermentativa de hidrógeno, fue previamente estudiada por Hurtado y Muñoz (2014), quienes pretratando este inóculo a 90°C durante 30 min y usando glucosa como sustrato de referencia, encontraron un rendimiento máximo de 1,56 mol H₂ mol⁻¹ glucosa.

El inóculo fue sometido a una etapa previa de aclimatación progresiva antes de su uso en cada uno de los experimentos. Esta actividad se realizó para obtener un inóculo enriquecido con microorganismos capaces de reconocer y usar la materia orgánica presente en el sustrato S2 como fuente de carbono y energía. La aclimatación del inóculo se realizó a temperatura y presión ambiente; para promover las condiciones anaerobias se empleó un recipiente cerrado de 2,0 L protegido de la luz solar o artificial, dentro de este recipiente se puso en contacto el inóculo con una mezcla de sustratos compuesta por agua residual del centro de sacrificio de ganado y agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca (S2). Con proporciones volumétricas, el 60% (1,2 L) del recipiente se llenó con el inóculo y el 40% (0,8 L) restante con la mezcla de los dos tipos de agua residual. Al inicio de la aclimatación fue mayor la proporción de agua residual del

centro sacrificio de ganado, y a medida que avanzó la aclimatación, se incrementó el volumen del sustrato S2.

Para cada experimento se realizó la etapa de aclimatación del inóculo. Para el experimento E1, la duración fue de 30 d y al observar la rápida respuesta del inóculo en la reducción de materia orgánica, el tiempo de aclimatación se redujo a 7 d en el experimento E2. Para reemplazar la mezcla de sustratos se aceptaron reducciones de la DQO_{Total} superiores a 60%. En la Tabla 3.2 se presentan las proporciones de los sustratos y la reducción de DQO obtenidas durante la aclimatación para el experimento E2.

Tabla 3.2 Aclimatación del inóculo

Dia	Relación entre AR del centro de sacrificio de ganado y S2 (%)	DQO (mg.L ⁻¹)		Reducción de DQO
		inicial	final	(%)
1	80/20	2.328	480	79
3	60/40	2.963	377	87
4	50/50	3.418	329	90
5	40/60	3.642	297	92
6	20/80	4.346	310	93
7	0/100	5.156	192	96

Finalizada la aclimatación, se determinó la AME del inóculo aclimatado, su resultado se presenta y discute en el ítem 3.2. En la Tabla 3.3 se presentan otras características fisicoquímicas del inóculo aclimatado.

Tabla 3.3 Características fisicoquímicas del inóculo aclimatado

Parámetro fisicoquímico	Unidades	Valor	
		E1	E2
pH	-	7,20	6,62
ST	g.L ⁻¹	50,93	66,98
SV	g.L ⁻¹	38,67	50,93

3.1.3 UNIDAD EXPERIMENTAL

Como unidad experimental se utilizaron botellas de vidrio color ámbar (reactor), con volumen útil de 400 mL y volumen de acumulación de gas “*headspace*” de 250 mL. Para cada reactor se dispuso una unidad de agitación magnética individual tanto para promover la mezcla completa (contacto constante entre sustrato y biomasa) como para incentivar la liberación del biogás dentro del reactor. Para estimular las condiciones anaerobias, los reactores presentaron cierre de tipo serológico, que facilitó el seguimiento de la presión y la extracción del biogás. En la Figura 3.2 se presenta una imagen de la unidad experimental usada en los experimentos E1 y E2.



Figura 3.2 Unidad experimental

3.1.4 SEGUIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE BIOGAS

El monitoreo de la presión interna o acumulada en cada reactor se realizó a través del método manométrico utilizando un manómetro digital marca Dawyer con rango de resolución entre 0 y 15 psi. A través de esta medición se trazó la curva experimental de presión acumulada de cada reactor, las cuales fueron similares a las curvas de presión descritas por [Norli et al. \(2011\)](#) y [Pirc et al. \(2012\)](#) en ensayos de biodegradabilidad anaerobia.

La curva de presiones teórica presenta un comportamiento similar a la curva de crecimiento bacteriano, por lo que en la curva experimental de presiones se identificaron tres fases que se asociaron con la fase de adaptación o *lag* (bajas presiones), fase de crecimiento exponencial (incremento exponencial de la presión) y fase estacionaria (presiones estables). La curva de presiones permite además de identificar las tres fases de las presiones, seleccionar y distribuir adecuadamente la extracción o toma de muestra de biogás. En el experimento E1 se extrajeron cuatro muestras de biogás por cada reactor y en el experimento E2 se extrajeron cinco muestras de biogás por cada condición evaluada. En la Figura 3.3 se presenta el manómetro usado para registrar la presión acumulada (a) y la curva teórica de presión acumulada (b).

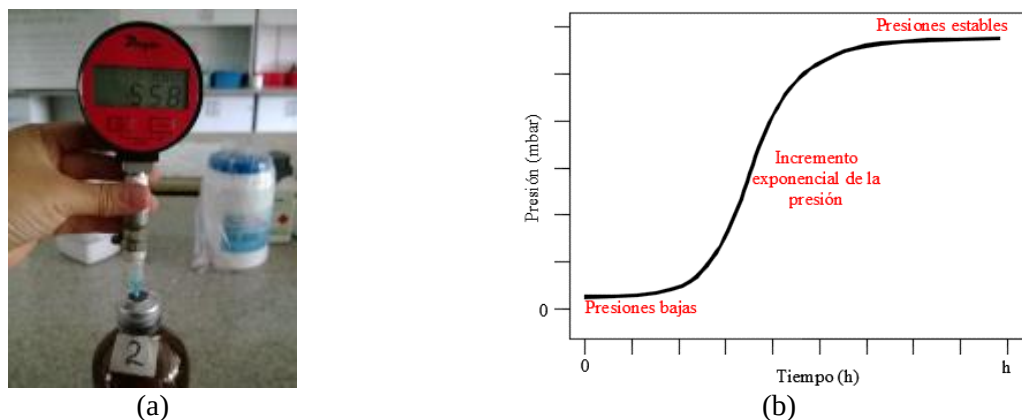


Figura 3.3 medidor de presión (a) y curva teórica de presión acumulada (b)

3.1.5 EXTRACCIÓN DEL BIOGAS

Durante el periodo de evaluación de cada experimento se recolectaron muestras de biogás. El biogás se extrajo del *headspace* a través de una jeringa de 5 mL acoplada a una válvula de tres vías (el acople fue recubierto con papel Parafilm) y se almacenó en viales al vacío para su posterior análisis. En la Figura 3.4

se presenta la forma de extracción y almacenamiento de biogás. Antes y después de extraer el biogás se determinaba la presión acumulada, para corregir la curva de presión debido a que la extracción del biogás interfería en la determinación de la presión total.



Figura 3.4 Toma de muestra de biogás

3.1.6 DESCRIPCIÓN DEL ARREGLO EXPERIMENTAL – E1

3.1.6.1 Pretratamiento del inóculo

Para evaluar el efecto del pretratamiento del inóculo sobre el HY se seleccionaron dos tipos de pretratamiento i) *Pre-tratamiento químico* y ii) *Pre-tratamiento térmico*.

Pretratamiento químico: para este pretratamiento se adoptó la metodología de [Penteado et al. \(2013\)](#) donde un volumen adecuado del inóculo aclimatado se expuso a una condición extremadamente ácida (pH: 3,0) durante 24 h, empleando una solución de HCl 1,0 N; una vez concluyó este periodo, el pH del inóculo se ajustó a un valor de 6,0 con una solución de bicarbonato de sodio (4%).

Pretratamiento térmico: para este pretratamiento se adoptaron la intensidad de la temperatura (85°C) y el tiempo de exposición (30 min) recomendado por [Hurtado y Muñoz \(2014\)](#), estos valores son similares a los presentados por [Nakhla et al. \(2008\)](#) y [Mohd et al. \(2011\)](#). De esta manera, el pretratamiento consistió en exponer una porción del inóculo aclimatado a un choque térmico a la temperatura y tiempo señalados.

Después de finalizados los dos pretratamientos, las dos porciones de inóculo pretratado reposaron a temperatura ambiente, en dos frascos de vidrio color ámbar protegidos de la luz solar o artificial, la boca del frasco se cubrió con un tapón de goma para evitar el contacto con el oxígeno del aire, hasta su posterior uso (< 24h). Las características fisicoquímicas de cada inóculo pretratado se presentan en la Tabla 3.4

Tabla 3.4 Caracterización fisicoquímica del inóculo pretratado

Parámetro	Unidad	Pretratamiento	
		Químico	Térmico
pH	-	5,90	7,48
ST	g.L ⁻¹	50,53	52,93
SV	g.L ⁻¹	36,87	39,60

3.1.6.2 Selección del pH inicial

El efecto del pH inicial sobre la producción de hidrógeno se evaluó en tres niveles: pH1 (5,7), pH2 (5,4) y pH3 (5,0). Estos valores fueron seleccionados en el rango entre 5,0 y 6,0 debido a que autores como [Trevisan \(2010\)](#) y [Fang y Liu \(2002\)](#) enuncian que ese rango de pH favorece: (i) la formación de productos intermediarios (ácidos orgánicos), (ii) la actividad de la enzima hidrogenasa y (iii) que las rutas metabólicas se direccionen hacia la producción de hidrógeno.

3.1.7 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL – E1

Una vez establecidas las condiciones iniciales, se calcularon los volúmenes de inóculo pretratado y sustrato a adicionar en cada reactor, estos volúmenes fueron calculados usando la Ecuación 3.1 propuesta por [Nasr et al. \(2011\)](#). Para este experimento (E1) se fijó una relación S/X de 2 g DQO.g⁻¹ SV, este valor fue establecido con base en las investigaciones de [Pakarinen et al. \(2008\)](#) y [Trevisan \(2010\)](#) que reportaban este valor en ensayos de flujo discontinuo para la producción fermentativa de hidrógeno.

$$S/X = \frac{V_t(L) \cdot C\left(\frac{g}{L}\right)}{V_s(L) \cdot X\left(\frac{g}{L}\right)} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

En la cual V_t es volumen total de reacción, C es la DQO inicial del sustrato, X es la concentración del inóculo pretratado (expresada en SV) y V_s es el volumen del inóculo a adicionar. Los volúmenes de inóculo y sustrato adicionados se presentan en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Volumen de lodo y sustrato adicionado en cada reactor

pH inicial	Pretratamiento Químico		Pretratamiento Térmico	
	Volumen (mL)			
	Inóculo	Sustrato	Inóculo	Sustrato
5,0 ± 0.1	14,5	385,5	13,5	386,5
5,4 ± 0.1				
5,7 ± 0.1				

Una vez establecidas las cantidades de sustrato e inóculo estas fueron adicionados a los reactores, primero se adicionó el inóculo con una porción del sustrato y se registró el pH de la mezcla, y se adicionaron gotas de la solución de bicarbonato de sodio o ácido clorhídrico según fuese el caso, hasta ajustar el pH de la mezcla al valor inicial deseado. Para promover la homogenización y completa disolución de los reactivos, se realizó una mezcla continua hasta lograr el ajuste final del pH, al finalizar se completó el volumen faltante de sustrato.

La adición pausada, mezcla y reposo evitó la adición excesiva de sustancias químicas, conservando unas condiciones propicias del medio acuoso para proteger la actividad de los microorganismos. Finalmente, se introdujo una pequeña barra magnética y los reactores fueron sellados con tapones de goma y agrafes de 30 mm e incubados durante 15 días, con agitación magnética constante para favorecer la transferencia de masa y a temperatura ambiente (entre 29,0 – 34,5°C) considerando el ambiente mesofílico que ofrece las condiciones de la ciudad de Cali (Colombia).

Cada condición de pH inicial se evaluó por triplicado, lo que resultó en un arreglo experimental de 18 reactores (9 por cada inóculo pretratado). Adicionalmente, se acompañó el experimento con un blanco por cada combinación de pH inicial y tipo de pretratamiento, debido a que se identificó en el inóculo la presencia de celulosa que podría ser usada como sustrato y por tanto, interferir en la lectura de producción

de biogás. La presión en estos reactores fue negativa, por lo que todo el biogás registrado se asoció con la transformación del sustrato adicionado. En la Figura 3.5 se presenta la distribución aleatoria de las unidades experimentales.



Figura 3.5 Arreglo experimental E1

3.1.8 SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN – E1

El monitoreo de la producción de biogás se realizó a través del seguimiento horario de la presión acumulada y temperatura ambiente. El registro se realizó con una frecuencia entre 2 y 3 h durante 15 d. El seguimiento finalizó cuando la curva de presión acumulada, presentó un comportamiento constante con tendencia a decaer. Al finalizar el experimento se recolectó una muestra de la fase líquida de cada reactor, para evaluar la transformación del sustrato.

Efecto del pretratamiento: Inicialmente, para estimar el efecto de los pretratamientos sobre las BCH se realizaron pruebas de AME, tanto con el inóculo aclimatado como con cada inóculo pretratado.

La evaluación fue realizada en función de *Producción acumulada de biogás (P_g)*, *rendimiento de hidrógeno (HY)* y *reducción de carbohidratos (%)*

3.1.9 DESCRIPCIÓN DEL ARREGLO EXPERIMENTAL – E2

3.1.9.1 Relación S/X

El efecto de la relación S/X sobre el HY se evaluó en tres niveles, los valores de la relación S/X seleccionados fueron 2, 4 y 6 g DQO.g⁻¹ SV; los cuales fueron seleccionados según lo expuesto por [Nasr et al. \(2011\)](#) quienes afirman que en el intervalo entre 2 y 10 g DQO.g⁻¹ SV se presenta la mayor reducción de carbohidratos y mayor HY, cuando se utilizan lodos anaerobios aclimatados.

3.1.9.2 Pretratamiento del inóculo y pH inicial

El pretratamiento del inóculo y pH inicial fueron seleccionados en función de los resultados del experimento E1. De esta manera, el inóculo para el experimento E2 fue sometido a un pretratamiento térmico de 85°C durante 30 min debido a que los resultados en el experimento E1 mostraron que el inóculo sometido a estas condiciones presenta un mayor rendimiento en la producción de hidrógeno y disminuye sensiblemente la AME ([Hurtado y Muñoz, 2014](#)). También el pH inicial se estableció en un valor de 5.4

debido a que a este valor se obtuvieron los máximos rendimientos de hidrógeno en el experimento E1 (Barrios, 2015) y es similar al recomendado por Fang y Liu (2002) para la producción fermentativa de hidrógeno a partir de glucosa.

3.1.10 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL – E2

El inóculo aclimatado fue sometido al pretratamiento térmico para lo cual se dispuso un volumen suficiente de este en un recipiente de vidrio y, se sometió a temperatura y agitación constante durante 30 min; el tiempo de exposición se registró a partir del momento en que toda la mezcla presentó una temperatura homogénea de 85°C. Las características fisicoquímicas del inóculo pretratado fueron pH: 7,46, SV: 52,06 g.L⁻¹ y ST: 68,58 g.L⁻¹. El inóculo pretratado no presentó AME, lo cual permitió verificar que el pretratamiento térmico fue adecuado para inhibir la actividad de BCH.

Finalizado el pretratamiento del inóculo fueron adicionados volúmenes de inóculo y sustrato en cada reactor en función de cada relación S/X. Los volúmenes fueron calculados usando la Ecuación 3.1 descrita anteriormente (ítem 3.1.7). Las cantidades adicionadas se presentan en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Volumen de lodo y sustrato adicionado en cada reactor

Relación S/X (g DQO.g ⁻¹ SV)	Volumen de inóculo (mL)	Volumen de sustrato (mL)
2	22	378
4	11	389
6	7	393

Una vez fueron introducidos el inóculo y sustrato dentro de cada reactor, se ajustó el pH inicial de la mezcla hasta el valor previamente establecido (pH = 5,4). Para el ajuste de pH se adicionó fosfato de sodio (Na₂HPO₄) debido a que esta sustancia a diferencia del bicarbonato de sodio usada en el experimento E1 no reacciona con los AGV evitando una drástica disminución del pH durante la fermentación (Davila-Vazquez et al., 2011). Finalmente, se introdujo una pequeña barra magnética y los reactores fueron sellados con tapones de goma y agrafes de 30 mm e incubados a temperatura controlada (33 ± 3°C) con agitación magnética constante.

3.1.11 SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN – E2

El monitoreo de la producción de biogás se realizó a través del seguimiento horario a la presión acumulada y temperatura. El registro se realizó manualmente con un manómetro digital; inicialmente se hicieron registros cada 4 h y luego entre 1 y 3 h. El experimento concluyó a las 55 h, cuando la curva de presión en función del tiempo presentó un comportamiento constante con tendencia a decaer.

Durante este periodo se recolectaron muestras de la fase gaseosa y de la fase líquida. Una vez extraído el biogás, los reactores eran descartados para caracterizar la fase líquida. Por lo tanto, este experimento (E2) se diseñó por triplicado para cada relación S/X e incluyendo triplicados para cada muestra de biogás, de esta manera se conservó la reproducibilidad y repetitividad estadística del experimento. También para corregir la perturbación sobre la curva de presión acumulada que genera la extracción de biogás.

Previamente, se determinó que por cada relación S/X evaluada se extraerían cinco (5) muestras de biogás distribuidas en el tiempo. De esta manera, el arreglo experimental fue de 15 reactores por cada

relación S/X, y en total todo el experimento estuvo compuesto por 45 reactores en paralelo. En la Figura 3.6 se presenta la distribución aleatoria de las unidades experimentales dentro de la incubadora.



Figura 3.6. Arreglo experimental E2

La toma de muestras de biogás se realizó en función del comportamiento de la curva de presión acumulada para distribuir las cinco (5) muestras en cada una de las fases de la curva de producción de biogás. Los tiempos en que se tomó la muestra de gas para cada relación S/X se presentan en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Tiempos de toma de muestra de gas - E2

Relación S/X (g DQO.g ⁻¹ SV)	Tiempo de toma de muestra de biogás (h)				
	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅
2	23	31	37	42	55
4	26	37	42	46	55
6	26	37	42	46	55

Adicionalmente, para cada relación S/X se incluyeron reactores de control, que contenían agua e inóculo pretratado, con el fin de permitir la corrección endógena de biogás e hidrógeno. Sin embargo, la presión acumulada de estos reactores fue negativa, indicando que no hubo producción endógena de biogás. Por lo tanto, el biogás e hidrógeno producido fueron atribuidos solo a la transformación del sustrato.

3.1.12 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.1.12.1 Composición del biogás

Las muestras de gas fueron analizadas en el Laboratorio de Saneamiento Ambiental de la Universidad Militar Nueva Granada ubicada en Bogotá, D.C.; se determinó el contenido de H₂, CH₄ y CO₂ a través de cromatografía de gases, se utilizó un cromatógrafo de gases Marca Agilent 7890A, equipado con una columna capilar Carboxen 1010 plot de longitud de 30 m y 0,32 mm de diámetro interno, argón fue el gas de arrastre; el protocolo similar al descrito por [Hernández Avilés et al. \(2016\)](#) disponía de tres rampas,

las cuales elevan la temperatura del horno a 60 °C con una tasa de 5 °C.min⁻¹, seguida de un aumento a 95 °C con una tasa de 25°C.min⁻¹ y finalizaba a 230 °C con una tasa de 24 °C.min⁻¹.

3.1.12.2 *Análisis fisicoquímico del sobrenadante*

En el experimento E1 la muestra líquida del sobrenadante de cada tratamiento se recolectó al final del ensayo, mientras que en experimento E2 se recolectaron cinco muestras del sobrenadante por cada relación S/X evaluada, lo que permitió construir una curva en función del tiempo de las variables fisicoquímicas analizadas. En la fase líquida se determinó la DQO y SST de acuerdo con los métodos estándar (APHA *et al.*, 2005), alcalinidad bicarbonática (AB) y total (AT) según Jenkins *et al.* (1983), ácidos grasos volátiles totales (AGV) fueron determinados adaptando el método descrito por DiLallo y Albertson (1961) y los carbohidratos totales (CH) según el método colorimétrico (DuBois *et al.*, 1956), la curva de calibración fue construida con sacarosa. Todos los parámetros de la fase líquida, excepto SST, fueron determinados después de centrifugar la muestra. Adicionalmente, la muestra para DQO fue filtrada a través de un filtro de fibra de vidrio de 0,45µm para remover material relacionado con el inóculo.

3.1.12.3 *Cálculos*

El volumen acumulado de hidrógeno se estimó como el producto entre la fracción volumétrica y el volumen del *headspace* (Ecuación 3.2).

$$H(t) = \left(\frac{V_{H_2}}{V_m} \right) 10^6 \times V_{headspace} \text{ Ecuación 3.2}$$

En la cual H (mL) es el volumen acumulado de H_2 , V_{H_2} (mL) es el volumen de hidrógeno contenido en la muestra inyectada en el cromatógrafo y V_m (mL) es la suma de los gases presentes en la muestra (H_2 , CH_4 y CO_2). Aplicando la ecuación general de los gases ideales, se determinó el número de moles totales (n_t) a partir de la presión acumulada (Ecuación 3.3).

$$n_t = \frac{PV}{RT} \text{ Ecuación 3.3}$$

En la cual n_t es el número de moles totales, P es la presión acumulada (atm), V es el volumen del *headspace* (0,25 L), R la constante universal de los gases ideales (0,082057 atm·L/mol·K) y T la temperatura del experimento. Luego, se usaron condiciones normales ($P=1\text{atm}$, $T=25\text{ °C}$) para calcular el volumen total de biogás (V_b) o producción acumulada de biogás (P_g).

El número de moles de hidrógeno fue determinado como el producto entre fracción volumétrica (V_{H_2}/V_m) y número de moles totales (n_t).

3.1.12.4 *Análisis cinético*

El modelo matemático de Gompertz modificado (Ecuación 3.4) se usó para ajustar las curvas de producción acumulada de hidrógeno, y para obtener los parámetros cinéticos. Este modelo matemático es usado para modelar los datos de producción de gas (Winsor, 1932).

$$H(t) = P \times \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m \times e}{P} \times (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \text{ Ecuación 3.4}$$

En la cual H (mL) es el volumen acumulado de H_2 o la cantidad de H_2 producido a un tiempo de incubación (t); λ (h) denota el periodo de latencia o retardo requerido para el inicio de la producción exponencial de H_2 ; P (mL) es la producción potencial máxima de H_2 ; R_m (mL/h) es la velocidad máxima de producción de H_2 y e es el número de Euler (2,718281828). Los parámetros (P , R_m y λ) fueron estimados con el software MicroFit, el cual usa un algoritmo de Newton-Gauss (Siqueira *et al.*, 2014).

El potencial de producción específica de hidrógeno-Ps (mL H_2 . g⁻¹ DQO_{adicionada}) se obtuvo dividiendo P entre la DQO inicial del sustrato. La máxima tasa de producción específica de hidrógeno – Tpe (mL H_2 .g⁻¹ SV.h⁻¹) se calculó como el cociente entre R_m y cantidad inicial de SV del inóculo (g). El HY (mol H_2 .mol⁻¹ CH removidos) se calculó dividiendo las moles acumuladas de H_2 entre las moles de sustrato removido (Zhang *et al.*, 2003, Marone *et al.*, 2017).

3.1.12.5 Análisis estadístico

▪ Experimento E1

En el experimento E1 se empleó un diseño experimental factorial mixto (2x3), dos factores (Factor A: pH inicial A y Factor B: tipo de pretratamiento del inóculo), el factor A en tres niveles y el factor B en dos niveles para probar que la variación de la combinación pH inicial-pretratamiento del inóculo no influye en la presión máxima de biogás (variable de respuesta). En la Figura 3.7 se muestra la organización de los factores usada para realizar las diferentes combinaciones de los niveles de pH inicial (5,0, 5,4 y 5,7) con los niveles del pretratamiento del inóculo (térmico y químico). Las combinaciones entre pH inicial y pretratamiento del inóculo fueron nombradas Qco5,7, Qco5,4, Qco5,0, Tco5,7, Tco5,4 y Tco5,0.

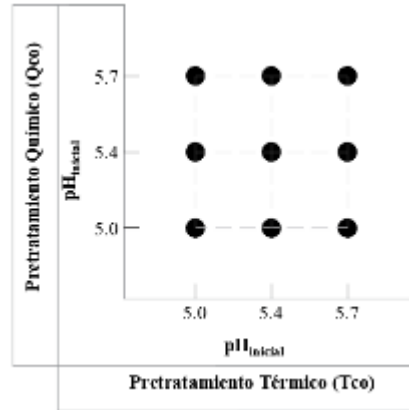


Figura 3.7 Combinaciones de tratamientos en un diseño 2x3 factorial

El modelo estadístico para este diseño está dado por la Ecuación 3.5.

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \alpha_j + \tau\alpha_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

Para $i = 1, 2, \dots, t$ $j = 1, 2, \dots, r$

En la cual:

Y_{ij} : Variable de respuesta de la j -ésima réplica del i -ésimo nivel (presión máxima de biogás - mBar)

μ : Media general

τ_i : Efecto del i -ésimo nivel del factor (Tipo de pre-tratamiento)

α_j : Efecto del j -ésimo nivel del factor (pH inicial)

$\tau\alpha_{ij}$: Efecto de la interacción entre ambos factores

ε_{ijk} : Efecto del error experimental asociado al i,j-ésimo nivel del factor y a la k-ésima réplica

i: 1,2 niveles

j:1, 2, 3 niveles

k: 3 replicas

Se realizaron las siguientes pruebas de hipótesis

Hipótesis nula (Ho): El tipo de pre-tratamiento, pH inicial e interacción, no afectan significativamente la presión máxima de biogás.

Hipótesis alterna: El tipo de pre-tratamiento, pH inicial e interacción, afectan significativamente la presión máxima de biogás.

$$H_0: \tau_i=0$$

$$H_1: \tau_i \neq 0$$

$$H_0: \alpha_j=0$$

$$H_1: \alpha_j \neq 0$$

$$H_0: (\tau\alpha)_{ij}=0$$

$$H_1: (\tau\alpha)_{ij} \neq 0$$

Para evaluar estadísticamente el efecto del tipo de pre-tratamiento, pH inicial e interacción sobre la presión máxima de biogás, se aplicaron las siguientes pruebas estadísticas: i) Valores individuales, ii) Interacción, iii) Análisis de varianza (ANOVA), iv) Prueba de normalidad, y v) POST ANOVA.

▪ Experimento E2

En el experimento E2 se empleó un diseño experimental completamente al azar de un solo factor con tres niveles para probar que la variación de la relación S/X no influye en el HY. El modelo estadístico para este diseño está dado por la Ecuación 3.6.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \text{ Ecuación 3.6}$$

Para $i = 1, 2, \dots, t$ $j = 1, 2, \dots, r$

En la cual:

Y_{ij} : Variable de respuesta de la j-ésima réplica del i-ésimo nivel

μ : Media general (sin tener en cuenta los niveles)

τ_i : Efecto del i-ésimo nivel del factor

ε_{ij} : Efecto del error experimental asociado al i-ésimo nivel del factor y a la j-ésima réplica

El análisis de un diseño completamente aleatorizado para un solo factor consiste en un análisis de varianza, para lo cual se plantearon las siguientes hipótesis nula (Ho) y alterna (Ha).

Hipótesis nula (Ho): La variación de la relación S/X no influye en el rendimiento de H_2

Hipótesis alterna (Ha): La variación de la relación S/X influye en el rendimiento de H_2

$$H_0: \tau_i=0 \quad H_1: \tau_i \neq 0$$

Las hipótesis fueron probadas a través de una varianza (ANOVA) unifactorial. Al rechazar la hipótesis nula y aceptar la alterna, es decir que había diferencias significativas entre los niveles evaluados, se aplicó el método de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD), para determinar cuál de los niveles era estadísticamente diferente con un nivel de significancia del 5%.

Los tres niveles del factor relación S/X fueron 2, 4 y 6 g DQO.g⁻¹ SV y la variable de respuesta fue el HY (mol.mol⁻¹ CH removidos).

3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2.1 EFECTO DEL PRETRATAMIENTO DEL INÓCULO Y pH INICIAL

En la Tabla 3.8 se presenta la caracterización en términos de AME de los inóculos, antes y después de los pretratamientos. Se observa que el inóculo aclimatado presentó una AME de 0,26 g DQO_{CH4}.g⁻¹ SV.d⁻¹, este valor es comparable con lodos anaerobios que presentan una alta actividad microbiana en la DA (Schneiders *et al.*, 2013), es decir, que esta magnitud es un reflejo de que la aclimatación fue realizada adecuadamente y, de la capacidad del inóculo tanto para producir metano como para consumir hidrógeno debido a la coexistencia de BCH y BPH.

Tabla 3.8 Actividad Metanogénica Específica en el inóculo

Inóculo	AME (g DQO _{CH4} .g ⁻¹ SV.d ⁻¹)	Inhibición de la AME (%)
Aclimatado	0,26	-
Pretratamiento Térmico	0,03	88,2
Pretratamiento Químico	0,01	97

La AME del inóculo aclimatado confirmó la necesidad de aplicar algún tipo de pretratamiento al inóculo para inhibir la presencia de BCH, antes de usarlo para el proceso de producción fermentativa de hidrógeno. Una vez sometido el inóculo aclimatado a los pretratamientos, la AME disminuyó en un 97% con pretratamiento químico y 88,2% con pretratamiento térmico. De acuerdo con Abreu *et al.* (2011), los pretratamientos térmico y químico actúan sobre la estructura y células de los lodos granulares metanogénicos para suprimir BCH. Por lo que, se presume que los dos pretratamientos fueron métodos eficientes para inhibir el crecimiento y actividad de BCH presentes en el inóculo.

3.2.1.1 Producción acumulada de biogás

En la Figura 3.8 donde se presentan las curvas de producción acumulada de biogás para el pretratamiento químico y térmico, se observa que después de una fase de latencia de 24 h y 48 h respectivamente, se inició la producción continua de biogás, la cual fue creciente durante 96 h, para posteriormente describir un “zigzag” decreciente. La máxima producción de biogás fue 91 mL para Qco5.4 y 86 mL para Tco5.0 en condiciones normales (CN 1 atm, 25°C).

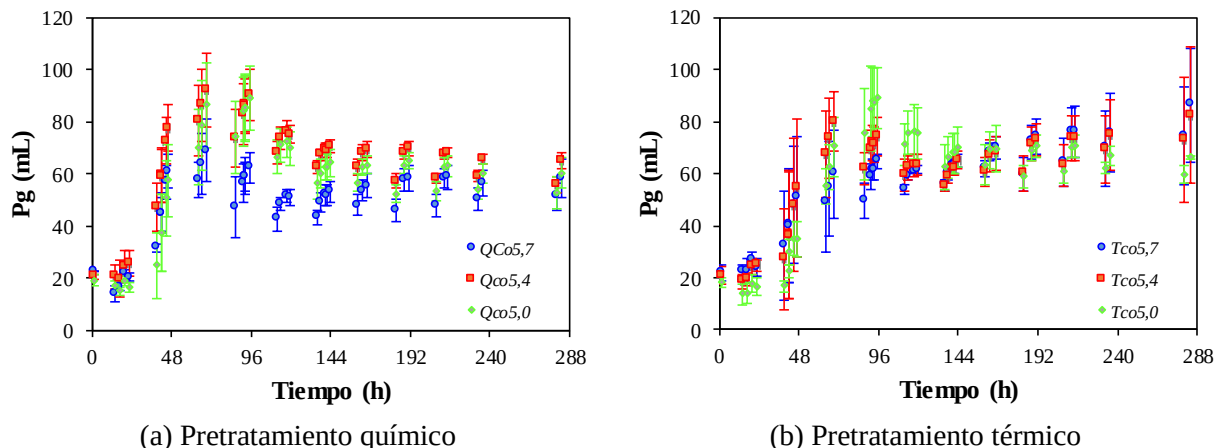


Figura 3.8 Producción acumulada de biogás (CN 1 atm, 25°C)

De acuerdo con [Norli et al. \(2011\)](#) y [Pirc et al. \(2012\)](#) el comportamiento observado puede ser el resultado de cambios en las poblaciones dominantes, por ejemplo arqueas hidrogenotróficas, las cuales consumen el biogás. También, para este experimento (E1) el “zigzag” de las curvas de presión acumulada es atribuido principalmente, a la variación de la temperatura ambiente. De acuerdo con la teoría cinética molecular de los gases, la temperatura influye directamente en la energía cinética de las moléculas de gas, lo que afecta la presión ejercida por los gases dentro del recipiente que las contiene ([Luo et al., 2010b](#), [Saratale et al., 2013](#)). Este que es un fenómeno físico no tuvo influencia sobre la producción de biogás, pero influyó sobre la presión que ejercieron las moléculas del biogás, provocando un comportamiento en “zigzag” que fue más evidente después de las 100 h, cuando la tasa de producción de biogás presentó un comportamiento constante con tendencia a disminuir. De la Figura 3.9 se puede establecer que, durante toda la ventana de observación, se formaron dos zonas o regiones horarias de temperatura dentro del rango mesofílico. La región 1 o zona de temperatura baja (entre 29°C y 32 °C) comprendida entre las 8:00 y 12:00 (medio día) y la región 2 o zona de temperatura alta (entre 32 y 34,5 °C) comprendida entre las 12:00 y 18:00 (final de la tarde) (Figura 3.9a). La amplitud de estas regiones se conservó durante toda la ventana de observación (Figura 3.9b) indicando de alguna manera, que el proceso estuvo expuesto a una variación cíclica de temperatura. Es interesante destacar que durante la fase de crecimiento exponencial de presiones acumulada que ocurrió dentro de las primeras 96 h, la variación de la temperatura ambiente no tuvo una incidencia fuerte sobre la presión del biogás, lo cual puede explicarse por el efecto de las reacciones de tipo catabólicas entre el sustrato e inóculo que al ser exotérmicas podrían haber liberado calor dentro del reactor conservando su temperatura interior. Por lo anterior, se puede concluir parcialmente que la variación de la temperatura ambiente introduce una perturbación en los resultados de las curvas de presión, no así en la producción de biogás y para este tipo de experimentos donde se aplica el método manométrico como herramienta de seguimiento indirecto a la producción de biogás resulta inadecuada la variación de la presión por efecto de fuerzas físicas y no por el proceso biológico.

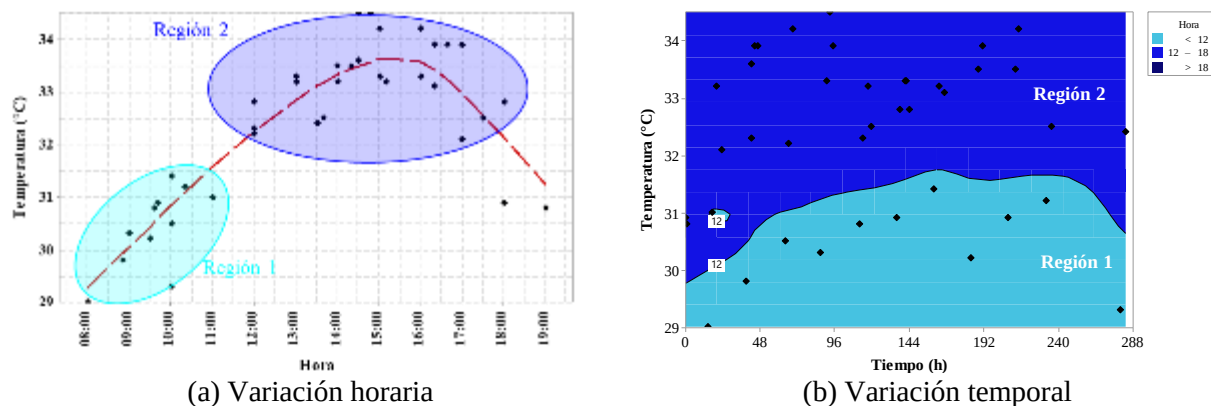


Figura 3.9 Variación de la temperatura ambiente

Los análisis de cromatografía de gases (Figura 3.10) indicaron que el biogás producido estuvo compuesto principalmente por CO_2 , H_2 y CH_4 . En las primeras 100 h fue mayor el contenido de H_2 (20 a 30%) respecto al CH_4 (0 a 10%), lo cual corresponde con una mayor producción molar de hidrógeno, por lo que se puede argumentar que en este periodo el proceso estuvo dominado por acidogénesis o fermentación de carbohidratos.

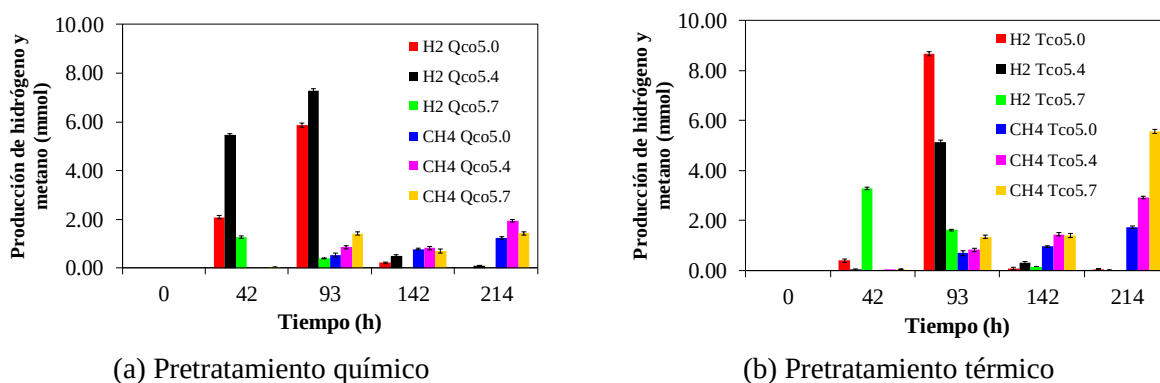


Figura 3.10 Composición molar del biogás

Los porcentajes de hidrógeno (20 a 30%) fueron consistentes con los observados en experimentos similares (O-Thong *et al.*, 2011). En esta etapa, las bacterias acidogénicas toman los carbohidratos que se encuentran en el medio en forma soluble (glucosa y sacarosa), y los excretan como sustancias orgánicas en forma de AGV (ácido acético, butírico, propiónico y láctico entre otros) e H_2 principalmente (Pavlostathis, 2011, Hallenbeck, 2013). En experimentos similares en los que se usan inóculos mixtos, esta producción de H_2 se asocia con la presencia de *Clostridium* o *Enterobacter* que sobreviven después de los diferentes pretratamientos (Wang y Wan, 2008).

Después de 100 h, se observa que el contenido de H_2 disminuyó rápidamente y se inició la formación de CH_4 , este comportamiento describe una metanogénesis incipiente, que se asoció con la presencia de arqueas metanogénicas hidrogenotróficas, las cuales usan el H_2 como donador de electrones para producir CH_4 (Aquino y Chemicharo, 2005b, Reginatto *et al.*, 2011), su presencia se atribuye a que los pretratamientos no fueron 100% eficientes, permitiendo que estos microorganismos reactivaran sus funciones metabólicas. Basados en el comportamiento observado, es posible argumentar que el efecto inicial de los pretratamientos fue efectivo durante las primeras 100 h y durante este periodo tuvo lugar la fermentación tipo acidogénica.

De acuerdo con [Xiao et al. \(2010\)](#), los cambios en la formación de productos (H_2 y CH_4) pueden ser atribuidos a cambios en la poblaciones microbianas dominantes, estimuladas por los sustratos dominantes, debido a que con la formación de H_2 se produce el agotamiento de carbohidratos necesarios para que BPH desarrollen sus actividades metabólicas y se establecen condiciones propicias para el recrecimiento de BCH, pues queda en el medio una mezcla de ácidos grasos volátiles, H_2 y CO_2 . Para evitar este consumo, [Kannaiah et al. \(2013\)](#) recomiendan en procesos continuos donde no hay agotamiento del sustrato, aplicar nuevamente el pretratamiento del inóculo después de 96 h, debido a que un solo ciclo de pretratamiento no es suficiente para evitar el re-crecimiento BCH.

3.2.1.2 Reducción de carbohidratos y reducción de AGV

Cada uno de los experimentos mostró una conversión completa de carbohidratos y una disminución en el contenido de AGV (Tabla 3.9). Partiendo de la base de que los carbohidratos son la fuente de carbono preferida para la producción fermentativa de hidrógeno ([Hawkes et al., 2002](#)), y el ácido láctico ha sido empleado como sustrato para la producción de hidrógeno ([Wu et al., 2012](#)), además de que es común encontrar en el agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, carbohidratos y AGV representados principalmente por ácido láctico ([Colin et al., 2007](#)), es posible suponer que estos fueron reconocidos por los microorganismos como co-sustratos fermentables y que la producción hidrógeno se realizó a través de la ruta metabólica de lactato/acetato ([Matsumoto y Nishimura, 2007](#), [Juang et al., 2011](#)).

Tabla 3.9 Carbohidratos y AGV al inicio y final del experimento, Reducción de AGV y pH final

Experimento	CH (mg.L ⁻¹)		Reducción de CH (%)	AGV (mg A. Acético.L ⁻¹)		Reducción de AGV (%)	pH final
	Inicial	Final		Inicial	Final		
<i>Qco5,7</i>	491	23,9 ± 2,6	95,1 ± 0,5	2.042	1.616 ± 142	20,9 ± 0,1	6,05 ± 0,06
<i>Qco5,4</i>		25,0 ± 6,6	94,9 ± 1,3		1.580 ± 106	22,6 ± 0,1	5,93 ± 0,07
<i>Qco5,0</i>		24,6 ± 8,5	95,0 ± 1,7		1.668 ± 90	18,3 ± 0,1	5,76 ± 0,11
<i>Tco5,7</i>		31,5 ± 6,5	93,6 ± 1,3		1.596 ± 334	21,9 ± 0,2	6,08 ± 0,17
<i>Tco5,4</i>		31,1 ± 1,1	93,7 ± 0,2		1.578 ± 292	22,7 ± 0,1	6,02 ± 0,11
<i>Tco5,0</i>		25,9 ± 3,0	94,7 ± 0,6		1.636 ± 82	19,9 ± 0,1	5,85 ± 0,04

± Desviación estándar; n = 3

Altas reducciones de carbohidratos han sido reportadas en estudios similares ([Wang y Wan, 2008](#), [Lucas et al., 2015](#)) asociados con una alta afinidad de los microorganismos por el sustrato. En este experimento, la alta reducción de carbohidratos también se debe a su baja concentración inicial, de acuerdo con [Kalyuzhnyi \(1997\)](#) las bacterias acidogénicas por su rápido crecimiento pueden agotar el sustrato (ej. glucosa o carbohidratos) en menos de 20 h. Por esta razón, los carbohidratos que son el sustrato preferido por las BPH, aún en bajas concentraciones son rápidamente consumidos en procesos de fermentación oscura ([Fernández et al., 2011](#)).

3.2.1.3 Rendimiento de hidrógeno (HY)

En la Figura 3.11 donde se presenta el rendimiento máximo de hidrógeno (HY_{max}) durante las primeras 100 h del experimento en fase acidogénica, se observa la influencia del pH inicial sobre el proceso, de acuerdo con un hallazgo similar presentado por [Khanal \(2003\)](#). Con el pretratamiento térmico el HY disminuyó a medida que se incrementó el pH. Así, se observó que el mayor HY fue obtenido con la

combinación Tco5,0 ($1,25 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ CH}$). Sin embargo, la tendencia de la curva de HY a incrementar con la disminución del pH sugiere que la zona de optimización del pH en combinación con el pretratamiento térmico podría encontrarse con valores de pH inferiores a 5,0. En ese caso, las rutas metabólicas podrían ser diferentes.

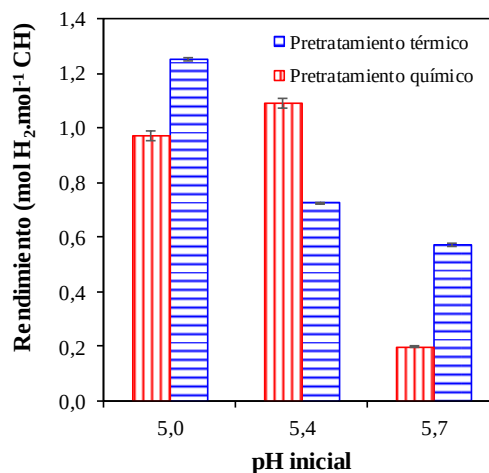


Figura 3.11 Rendimiento máximo de hidrógeno (Ymax)

Respecto al tratamiento químico, el HY también mostró una dependencia con el pH, señalando que el máximo valor ($1,10 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ CH}$) se obtuvo con la combinación Qco5,4 y con valores de pH inferiores o superiores a 5,4 el rendimiento disminuyó, es decir que alrededor de este pH podría ubicarse la zona de optimización para esta variable en combinación con el pretratamiento químico. Los rendimientos de H_2 observados fueron semejantes a los reportados en estudios similares, en los que han empleado inóculos puros o mixtos con sustratos que se diferencian en algunas características como pureza y concentración (Chen *et al.*, 2008a, Cappelletti *et al.*, 2011, Norli *et al.*, 2011).

Los bajos rendimientos de hidrógeno obtenidos en los tratamientos Qco5,7 ($0,20 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ CH}$) seguido de Tco5,7 ($0,58 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ CH}$) pueden ser atribuidos al recrecimiento incipiente de BCH, las cuales en rangos de pH más cercanos a la neutralidad pueden encontrar mejores condiciones ambientales para restituir sus funciones fisiológicas (Torres *et al.*, 2008), y conseguir la estabilidad que necesitan para llevar a cabo la formación de metano a partir del consumo de hidrógeno. De esta manera, se observó que el pH inicial entre 5,4 y 5,0, donde se encontró el mayor HY, también ayudó a prolongar la inhibición de BCH obtenida con los pretratamientos (térmico y químico), lo cual es congruente con lo expuesto por Grimmer *et al.* (2011).

La similitud entre los rendimientos máximos observados en la combinación Tco5,0 y Qco5,4, no permitió diferenciar estadísticamente un pretratamiento de otro ($p=0,533$), es decir, que el HY no fue influenciado por este factor. Mientras que el pH inicial tuvo una influencia significativa sobre el rendimiento de hidrógeno ($p<0,005$). Adicionalmente, es importante resaltar la necesidad de usar algún tipo de pretratamiento cuando se emplean inóculos mixtos para la producción fermentativa de hidrógeno, debido a que estos tal como se demostró con los resultados de AME, contienen BCH que no indeseables en procesos de producción de hidrógeno (Venkata Mohan, 2009).

Al revisar las ventajas de cada uno de los métodos, se encontró que el tratamiento térmico a pequeña escala, por su simplicidad y rapidez, es aceptado tanto para inhibir BCH como para proporcionar estabilidad del inóculo, frente al recrecimiento de BCH (Goud *et al.*, 2014). Igualmente, la combinación con pH de 5,0

permite una mejor actividad de la enzima hidrogenasa, lo que incentiva el aprovechamiento de carbohidratos, formación de ácidos orgánicos, H_2 y CO_2 (Masset *et al.*, 2010) y desde una perspectiva económica, podría resultar más benéfico al requerir menor cantidad de alcalinizante, debido a que el agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, generalmente presenta bajos valores de pH, entre 4,0 y 4,5.

3.2.2 EFECTO DE LA RELACIÓN S/X

De manera general, los análisis de cromatografía de gases indicaron que el biogás estaba constituido por una mezcla de H_2 y CO_2 , libre de CH_4 , (Figura 3.12), indicando la ocurrencia de la fermentación oscura y ausencia de actividad metanogénica en el lodo; esta última como resultado del pretratamiento térmico aplicado. Para todas las relaciones S/X el contenido de H_2 en el biogás se incrementó a medida que transcurrió el tiempo de la fermentación hasta encontrar un valor máximo a partir del cual mostró una tendencia a disminuir en el caso del sustrato S1 o a mantener su contenido en el caso del sustrato S2. Lo anterior describe el comportamiento esperado en los ensayos tipo “batch” o discontinuos en los cuales no hay renovación del sustrato y, por lo tanto, se espera un agotamiento del sustrato hacia el final del periodo de observación que en este caso se expresa a través del cese o disminución en el contenido de biogás.

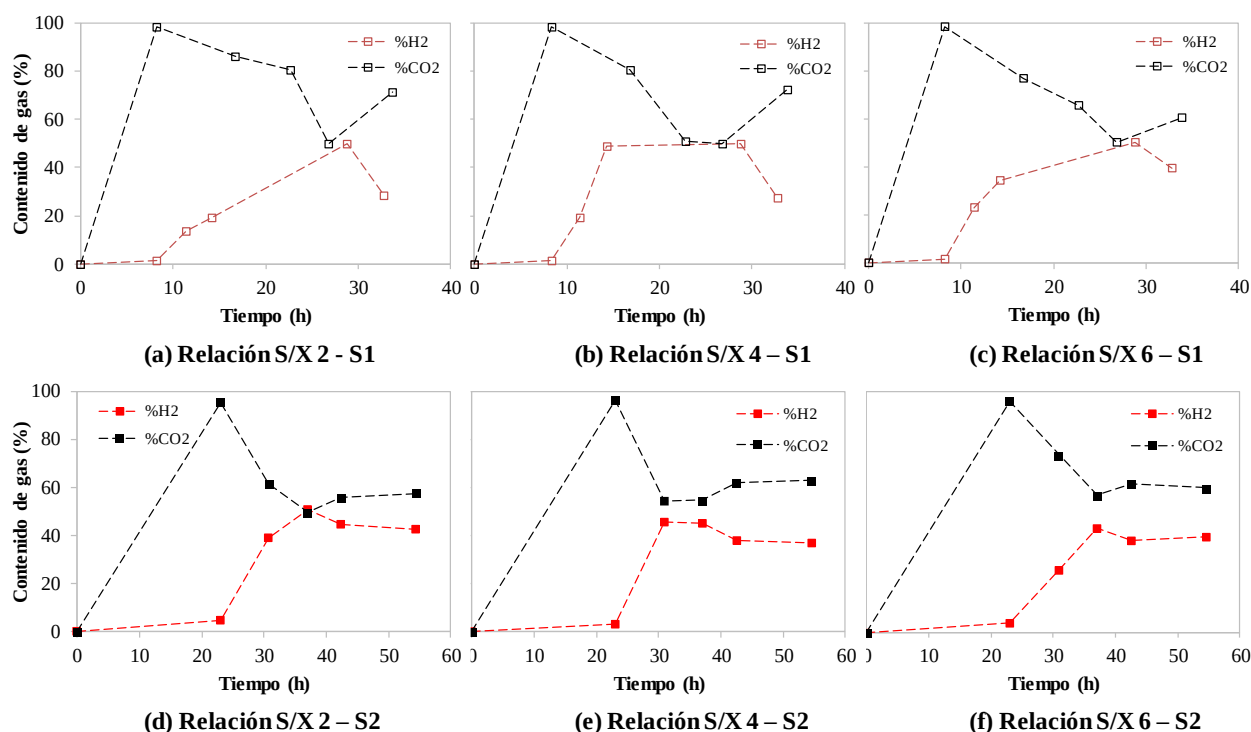


Figura 3.12 Composición porcentual del biogás

El contenido máximo de H_2 en el biogás, tanto para S1 como para S2 en cualquiera de las relaciones S/X no fue superior a 51%, esto se debe a que la composición inicial de los sustratos fue similar y además indica, una fuerte utilización del sustrato por parte de la biomasa. En un experimento similar usando un sustrato sintético con una concentración de $11g.L^{-1}$ de sacarosa Liu y Shen (2004) reportaron un contenido de H_2 en el biogás entre 32 y 58%.

3.2.2.1 Consumo del sustrato, producción de AGV y pH final

La DQO total inicial de los sustratos (S1 y S2) fue $5,8 \text{ g.L}^{-1}$ para todos los experimentos. S1 y S2 presentaron una diferencia en la concentración inicial de CH, $3,9$ y $1,32 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, la cual se atribuye a que S1 es un sustrato simple donde la DQO es ejercida únicamente por su contenido de sacarosa, mientras que S2 corresponde con el efluente de un proceso agroindustrial parcialmente acidificado, cuyo contenido de AGV ($885 \text{ mg A.acetico.L}^{-1}$) y CH ejercieron la DQO inicial.

La rápida reducción de la DQO y CH observada durante el ensayo (Figura 3.13) indica la afinidad que presentaron los microorganismos por los sustratos. Con S1 la reducción de DQO fue $40 \pm 1\%$, $35 \pm 2\%$ y $37 \pm 3\%$ para la relación S/X 2, 4 y 6 respectivamente; mientras que con S2 fue $56 \pm 2\%$, $48 \pm 7\%$ y $40 \pm 3\%$ en el mismo orden. Estos niveles de reducción de DQO que no se pueden catalogar como altos o bajos son característicos de la fermentación oscura, y lo que indican es la presencia de un sustrato disponible para la fermentación y que es probable que ocurra la producción de AGV con la subsecuente reducción del pH (Cappelletti *et al.*, 2011); acoplado a la producción de hidrógeno que ocurre por el consumo de CH se producen diferentes AGV y alcoholes los cuales contienen átomos de carbono que ejercen DQO (Torquato *et al.*, 2017), por esta razón durante la fermentación oscura la reducción de DQO es variable.

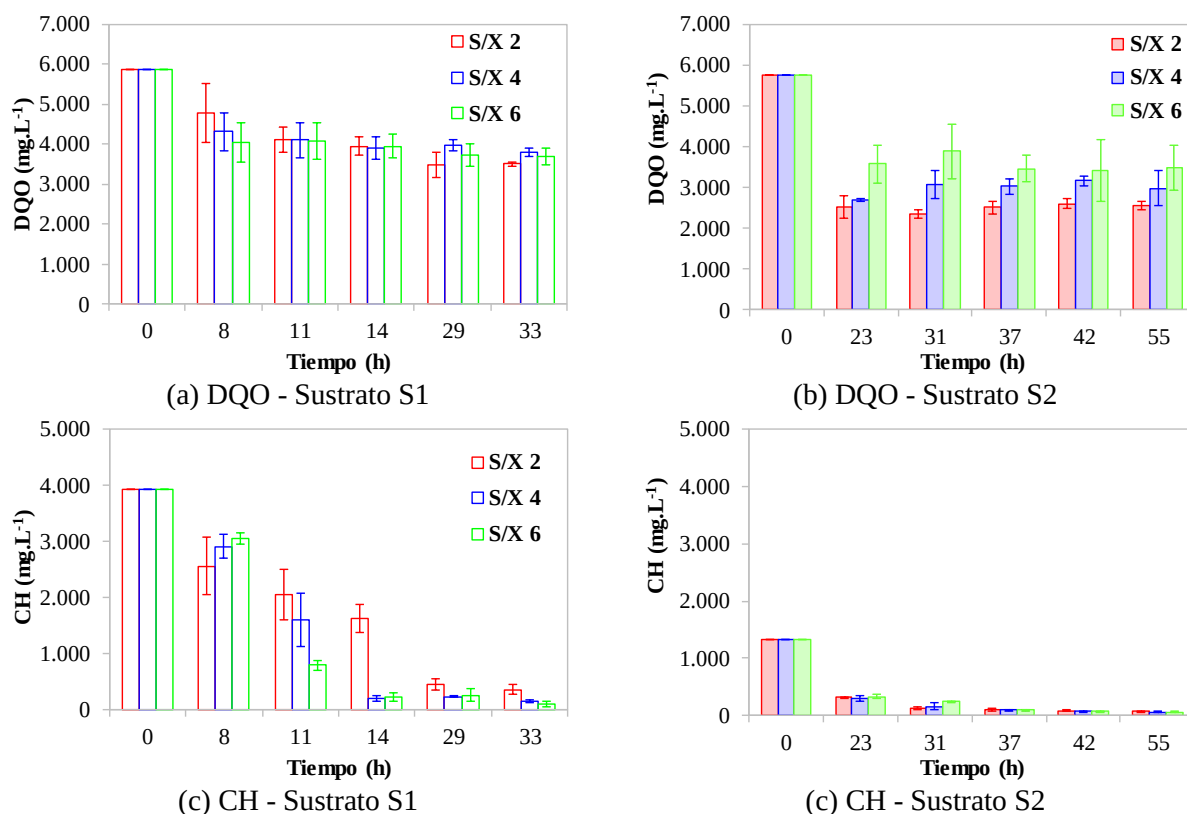


Figura 3.13 Concentración de DQO y Carbohidratos totales durante la producción de hidrógeno a diferentes relaciones de sustrato: inóculo

Por otro lado, una comparación directa de la reducción de la DQO entre el S1 y S2 muestra que fue mayor para S2, lo cual indica de manera preliminar que la producción de AGV a partir del consumo de CH, que son los principales compuestos que ejercen la DQO al final de un experimento que involucra la fermentación oscura, fue menor para S2. Adicionalmente, por la composición del sustrato es probable que una porción de los compuestos que ejercían la DQO inicial, en este caso AGV también fueron consumidos durante la fermentación explicando el fuerte descenso en la concentración de la DQO observada con el sustrato S2 (Figura 3.13 b) y a partir del cual se obtuvo una mayor reducción de DQO. El uso de AGV (ej.

ácido láctico y ácido acético) como sustratos para producción fermentativa de H_2 ha sido previamente reportada por [Lee et al. \(2010\)](#) y [Ohnishi et al. \(2010\)](#). Por lo tanto, es posible que durante la fermentación del S2 algunos AGV fueron usados como cosustratos para la producción de H_2 y otro tipo AGV de cadena más corta como ácido butírico; esta hipótesis se ratifica con los resultados de [Rojas-Chacón \(1999\)](#) quien a través del estudio de un reactor hidrolítico (reactor acidogénico) alimentado con agua residual derivada de las rallanderías del Norte del Cauca (Colombia) observó que el ácido láctico presente en este efluente era transformado en ácido butírico, propiónico y acético durante la fase acidogénica.

Con relación al efecto de la variación de la relación S/X, al final del experimento, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el valor medio de la reducción de DQO con el sustrato S1. Por el contrario, con el sustrato S2 se encontró que la reducción media de DQO con la relación S/X 2 difiere estadísticamente de la observada con la relación S/X 6 ($p < 0,05$). Este resultado sugiere que para un sustrato simple como S1 la disponibilidad de sustrato por unidad de microorganismos (relación S/X) en los niveles evaluados no tuvo influencia sobre las rutas catabólicas responsables de la producción de AGV, toda vez que estos subproductos son las principales sustancias que ejercen la DQO final y que al hacer un balance alrededor de la DQO dan como resultado los niveles de reducción de DQO observados. El efecto de la variación de la relación S/X sobre la reducción de DQO se evidenció al utilizar un sustrato de mayor complejidad como el sustrato S2, mostrando que a mayor disponibilidad de sustrato por unidad de microorganismos menor fue el consumo del sustrato, en este caso los AGV iniciales se encontraban en mayor proporción en el sustrato que los CH, por lo tanto, las BPH estaban expuestas a una mayor disponibilidad de AGV. De acuerdo con [Infantes et al. \(2011\)](#) la eficiencia y tasa de fermentación pueden estar relacionadas con los efectos de inhibición causados por la permeabilidad de los ácidos no disociados a través de la membrana celular. Una vez dentro de la célula, estos ácidos no disociados se disocian, liberando un protón (H^+), debido al mayor pH intracelular. En esta situación, y con el objetivo de mantener el pH intracelular, las células deben gastar energía metabólica para excretar esos protones contra un gradiente de concentración. En este estudio, con el incremento la relación S/X también se aumentó indirectamente el gradiente de concentración y, por lo tanto, forzando a los microorganismos a consumir mayor energía para mantener el transporte activo de protones, limitando así el metabolismo de las células, dando como resultado un menor consumo de AGV y por lo tanto menor reducción de DQO en función del incremento de la relación S/X.

También al finalizar los experimentos la reducción de CH fue superior al 92% para los dos sustratos evaluados y no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el valor medio de la reducción de CH en función de las relaciones S/X. Eso sugiere que la alta tasa de utilización de los CH iniciales durante la fermentación no fue influenciada por el tipo de sustrato ni por la variación de la relación S/X. Además, que en ninguna de las relaciones S/X la concentración de CH causó inhibición de los microorganismos, incluso en la relación S/X más alta que contenía la menor cantidad de biomasa y, por tanto, mayor disponibilidad de sustrato por unidad de microorganismo.

3.2.2.2 Producción de AGV y pH final

Observando la Figura 3.14a, que muestra el comportamiento del pH y la producción de AGV con el sustrato S1, se puede indicar que los AGV formados fueron el resultado del consumo de carbohidratos previamente presentado en la Figura 3.13a, y que el incremento de AGV en el sistema causó un drástico descenso en el pH. Considerando el comportamiento descrito y que el único sustrato disponible estaba representado en forma de sacarosa soluble es posible suponer que la fermentación del sustrato S1 se realizó vía producción de acetato y butirato debido a que este tipo de acidogénesis es la más común cuando se usan sustratos simples y conduce a la producción de butirato, acetato, H_2 y CO_2 ([Hasan et al., 2015](#)), evita la

acumulación de equivalentes reductores inhibitorios y permite la regeneración de los equivalentes reductores y la síntesis de ATP (adenosina trifosfato) (Buitron *et al.*, 2014).

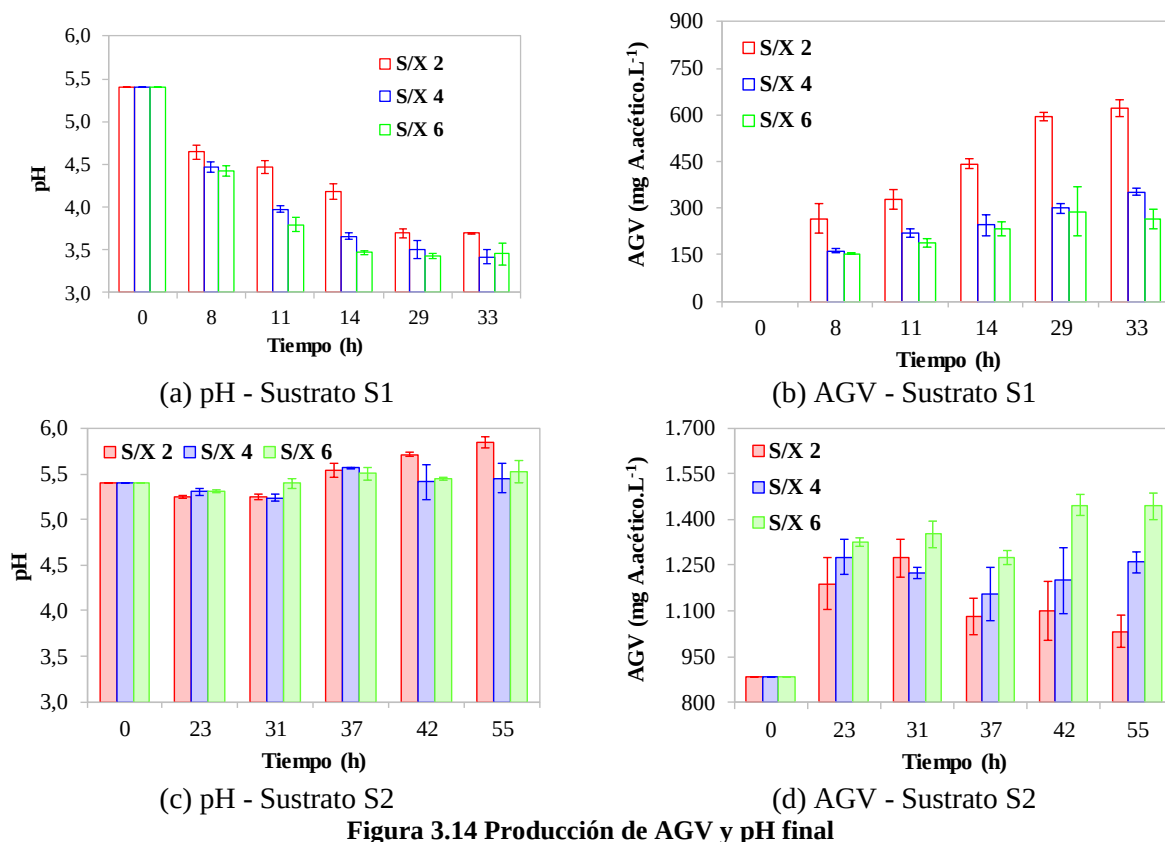


Figura 3.14 Producción de AGV y pH final

Para el experimento con S1 se estableció una correlación lineal negativa entre el pH del medio de reacción y la concentración de AGV ($R^2 > 0,9555$) es decir que la producción de AGV disminuyó a medida que disminuyó el pH, este comportamiento que fue similar en las tres relaciones S/X describe a un ciclo de retroalimentación negativa característico de la fermentación acidogénica en la cual la tasa de formación o producción de AGV disminuye debido a que la acumulación de AGV produce un descenso en el pH con la consecuente inhibición del proceso de fermentación (Trad *et al.*, 2015). Al finalizar el experimento, la concentración máxima de AGV para la relación S/X 2 fue significativamente más alta que la observada con la relación S/X 4 y S/X 6 ($p < 0,05$) los valores fueron 622 ± 29 , 352 ± 13 y 289 ± 79 mg A.acético.L⁻¹ respectivamente. Este resultado indica que la producción de AGV fue influenciada por la variación de la relación S/X, y que disminuyó a medida que se incrementó la relación S/X. Este resultado puede ser explicado a través del planteamiento de Stavropoulos *et al.* (2016) quienes exponen que, en condiciones inadecuadas de pH, incluso las BPH gastan el ATP producido para mantener la neutralidad en su interior, en vez de producir hidrógeno y conjuntamente AGV. En el experimento E2 el incremento de la relación S/X se realizó disminuyendo la concentración de sólidos volátiles iniciales, es decir, disminuyendo la biomasa, y al iniciar la fermentación se fomentaron condiciones ácidas promovidas por la formación de AGV, estas dos condiciones influyeron sobre el gradiente de concentración de hidrogeniones (H^+) por unidad de microorganismo (o gradiente específico). Por lo tanto, al haber menos microorganismos en el medio debido al incremento de la relación S/X, mayor era el gradiente específico de H^+ por lo que, mayores niveles de ATP debían usar los microorganismos para mantener su neutralidad, sacrificando la producción de AGV. Un resultado similar fue explicado por Castro-Villalobos *et al.* (2012b) argumentando que la tasa de generación de biohidrógeno y por lo tanto de AGV depende de la concentración de la biomasa debido a que el

incremento en la concentración de los productos de la fermentación (AGV) eleva los requerimientos de energía (ATP) para el mantenimiento celular por el efecto contrario que ejerce sobre el pH.

Con relación al S2, su composición inicial permite suponer que la ruta de fermentación fue distinta a la observada con S1, y que pudo ser la ruta de fermentación de lactato/acetato la que tuvo lugar con este sustrato, debido a que se ha reportado que en agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca los AGV iniciales se relacionan principalmente con ácido láctico seguido de ácido acético (Colin *et al.*, 2007, Gomes *et al.*, 2016); Gomes *et al.* (2016), y que el ácido láctico en presencia de acetato puede ser usado como sustrato para la producción fermentativa de hidrógeno (Grause *et al.*, 2012, Wu *et al.*, 2012).

En la Figura 3.14 b se observa que con el sustrato S2 la producción de AGV no disminuyó significativamente el pH del medio de reacción. Este resultado que es contrario a lo esperado (debido a que la producción de AGV debería disminuir el pH del medio), puede ser consecuencia del incremento de alcalinidad bicarbonática (AB) (Figura 3.15). De acuerdo con Xiao *et al.* (2010), en procesos de fermentación oscura con baja concentración de CH (por ej. $< 1.603 \text{ mg.L}^{-1}$) como la que presentó S2, se favorece la liberación de amonio ($\text{NH}_4^+ - \text{N}$) a partir de la hidrólisis del lodo. Por su parte, el ion amonio es una especie con la capacidad de incrementar el pH y la alcalinidad en los sistemas de fermentación (Sittijunda *et al.*, 2010). Así, la formación de esta especie podría haber evitado un dramático agotamiento del pH tras la producción de AGV, y permitido sostener el pH en $5,5 \pm 0,2$ para S/X 2 y en $5,4 \pm 0,1$ para la relación S/X 4 y S/X 6. Este efecto no fue evidenciado con la fermentación de S1 debido a que la concentración de CH fue superior a lo sugerido por el autor y además no hubo formación de AB.

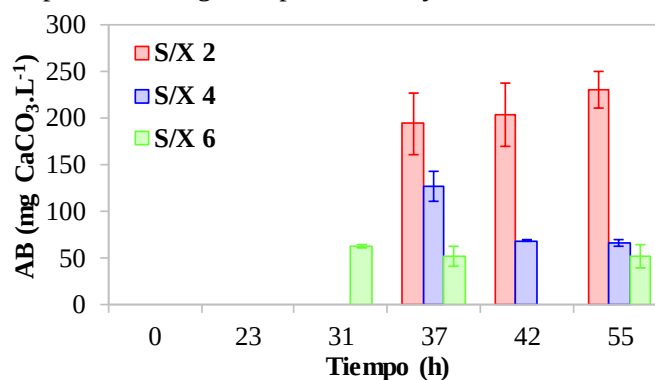


Figura 3.15 Alcalinidad Bicarbonática

En el caso del sustrato S2, la producción de AGV se incrementó con el aumento de la relación S/X, contrario a lo observado con S1, indicando un mayor aprovechamiento del sustrato para la producción de AGV. Sin embargo, la actividad biológica de las BPH estuvo fuertemente ligada a las condiciones ambientales, que en este caso fue favorecida por un control imprevisto del pH gracias a la formación accidental de AB. Por lo que es posible resaltar la importancia de controlar el pH de la fermentación oscura en un nivel óptimo para evitar el gasto de energía (ATP) que se ocasiona por la presencia de ácidos disociados. Así, con una menor cantidad de biomasa (mayor relación S/X) se obtuvo un mayor rendimiento de AGV lo cual se observó al finalizar el experimento cuando se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las concentraciones de AGV, las cuales fueron 1.032 ± 52 , 1.347 ± 34 y 1.480 ± 44 mg HAC/L para S/X 2, S/X 4 y S/X 6 respectivamente.

3.2.2.3 Producción acumulativa de biogás (Pg), Rendimiento de biogás e hidrógeno y tasa de rendimiento específico

Los parámetros cinéticos de las curvas de producción acumulada de biogás (Pg) estimados según la Ecuación 3.4 se presentan en la Tabla 3.10. La producción acumulada de biogás presentó un buen ajuste a la ecuación de Gompertz modificada ($R^2 > 0,89$, ver Tabla 3.10). Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) sugiere que los parámetros estimados (λ , R_m y P) a diferentes relaciones S/X para diferentes sustratos (S1 y S2) fueron estadística y significativamente diferentes ($p < 0,05$). Sin embargo, cuando se realizó una comparación interna de los parámetros cinéticos a nivel de sustrato con cada relación S/X se observó que la fase de latencia (λ) no estuvo influenciada por la variación de la relación S/X, es decir, que este factor no tuvo influencia sobre este parámetro cinético a nivel de cada sustrato. Por lo que en promedio para cada sustrato (S1 y S2) la fase de latencia (λ) fue $6,8 \pm 0,37$ h y $27,9 \pm 1,1$ h respectivamente, la notable diferencia en estos valores se atribuye a las características propias del sustrato, debido a que el inóculo fue el mismo. De acuerdo con [Chou et al. \(2008\)](#), la fase de latencia representa el tiempo de germinación de los microorganismos formadores de esporas que generan H_2 , para este estudio se encontró que la fase de latencia de S2 fue 4,1 veces mayor respecto a S1, este retraso se puede atribuir a la naturaleza compleja de los enlaces del almidón (enlaces- α) comparada con los enlaces simples de la sacarosa, tal como lo sugiere [Khanal \(2003\)](#).

Tabla 3.10 Resumen de los datos obtenidos para la producción acumulada de biogás a diferentes relaciones S/X

Parámetro	Sustrato					
	S1			S2		
	Relación S/X					
	2	4	6	2	4	6
λ (h)	6,14 ± 0,26	6,59 ± 0,49	7,68 ± 0,35	26,90 ± 0,95	27,09 ± 1,27	29,77 ± 1,13
R _m (mL.h ⁻¹)	17,17 ± 0,82	13,35 ± 0,89	13,26 ± 0,54	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,03
P (mL)	204,28 ± 3,02	210,30 ± 7,35	262,97 ± 8,83	145,51 ± 8,39	131,77 ± 10,49	118,26 ± 8,78
Ajuste R ²	0,97	0,92	0,96	0,91	0,90	0,89

El resultado anterior sugiere que un sustrato simple (S1) disminuye significativamente el tiempo de germinación de las BPH, mientras que un sustrato de mayor complejidad (S2) lo incrementa. Para la producción biológica de hidrógeno a mayor escala, este resultado puede tener un impacto importante sobre la duración del periodo de arranque de los reactores productores de hidrógeno (hidrogenogénicos), mostrando que la complejidad del sustrato debe incluirse dentro de la lista de factores principales como TRH, carga orgánica, nutrientes, pH y tipo de inóculo, que afectan esta etapa ([Bakonyi et al., 2014](#)), así como explorar la posibilidad de que sustratos más complejos puedan sufrir una etapa previa de hidrólisis para reducir el periodo de arranque de estos reactores.

Con relación a los otros parámetros cinéticos se observó que para el sustrato S1 se obtuvo la mayor tasa de producción (R_m) con la relación S/X 2 ($17,17 \pm 0,82$ mL_{biogás}.h⁻¹) mientras que la mayor producción potencial (P) fue obtenida con la relación S/X6 ($262,97 \pm 8,83$ mL_{biogás}). Estos resultados son congruentes con el planteamiento del experimento, debido a que está mostrando que en presencia de mayor biomasa (relación S/X 2) se incrementa la velocidad a la cual se utiliza el sustrato. Sin embargo, cuando se reduce la biomasa (relación S/X 6) también se reduce el gasto energético por mantenimiento celular permitiendo obtener una mayor producción de biogás. De esta manera, con el objetivo de maximizar la producción biogás a partir del sustrato S1 resulta de mayor interés disminuir el contenido de biomasa con relación al sustrato disponible debido a que los resultados anteriores relacionados con el consumo del sustrato mostraron que también en la relación S/X 6 se consumió casi la totalidad de los carbohidratos por lo que no había un desacople entre el anabolismo y catabolismo.

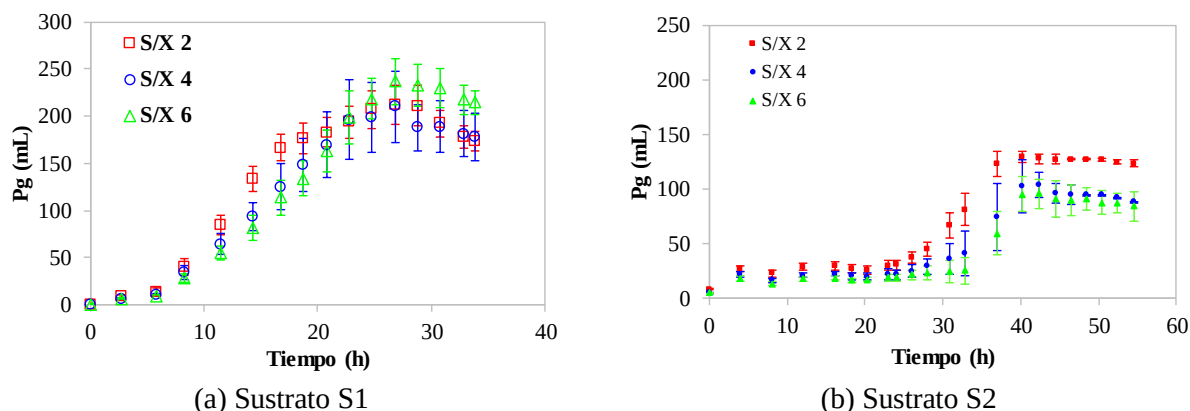


Figura 3.16 Producción acumulada de biogás (Condiciones normales 1 atm, 25°C)

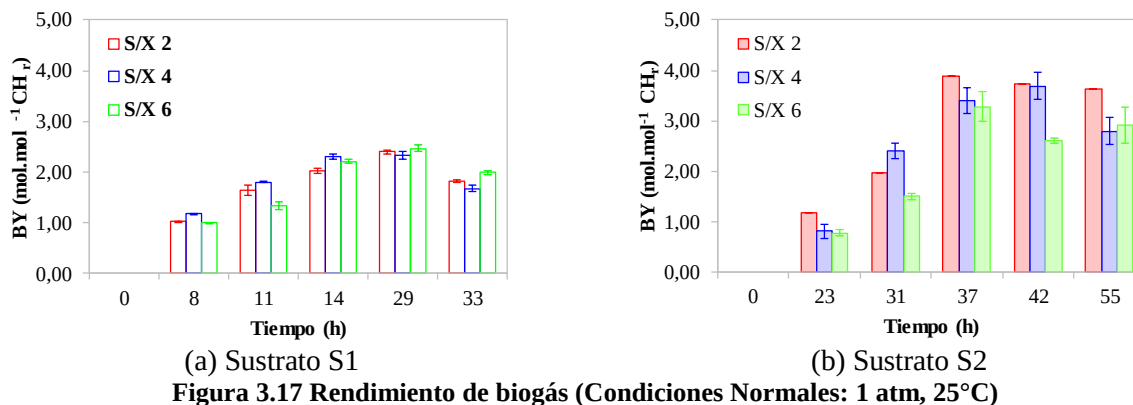
Por otro lado, los resultados del análisis estadístico de los parámetros cinéticos R_m y P del sustrato S2 indicaron que no había diferencias significativas entre estos al variar la relación S/X. Teniendo en cuenta que la relación S/X afecta significativamente tanto las características cinéticas y metabólicas de los microorganismos (Liu, 1996) y que estudios similares han demostrado que el retraso significativo en la fase de latencia como el observado en este estudio con S2 (Figura 3.16 b) puede asociarse con la presencia de ácido láctico (Kim *et al.*, 2012b), es posible suponer que en el caso de la fermentación del sustrato fueron las características metabólicas de los microorganismos las que influyeron para que en las tres relaciones S/X la cinética reacción y por tanto los parámetros cinéticos (R_m y P) fueran similares, toda vez que la Pg con S1 puede atribuirse únicamente al consumo de CH, debido a la materia orgánica disponible estaba representada por el contenido de sacarosa adicionada, mientras que para S2, la Pg pudo ser consecuencia del consumo paralelo entre CH y AGV representados inicialmente por ácido láctico. Finalmente, se observó que la Pg fue significativamente mayor con S1 respecto a S2 para cual relación S/X evaluada, este resultado es consecuencia de la diferencia en la concentración inicial de CH la cual fue notablemente mayor para S1.

El rendimiento de biogás (BY) durante la fermentación de S1 y S2 se presenta en la Figura 3.17. En los dos casos, el rendimiento de biogás fue creciente hasta encontrar un valor máximo, a partir del cual presentó una tendencia a disminuir. También se observó una notable diferencia entre los valores de S1 y S2, siendo mayores los obtenidos con S2. Esta diferencia puede ser causada por la disminución del pH del medio de reacción, provocado por la producción de AGV, en el caso de S1. De acuerdo con Infantes *et al.* (2012), la energía requerida para el mantenimiento celular es mayor cuando el pH es bajo. En consecuencia, es posible suponer que la liberación de electrones como hidrógeno molecular, disminuyó proporcionalmente con el descenso del pH. Por lo tanto, la energía producida derivada de la transformación de los carbohidratos fue usada para el mantenimiento celular, sacrificando el crecimiento celular y con ello la liberación de H_2 .

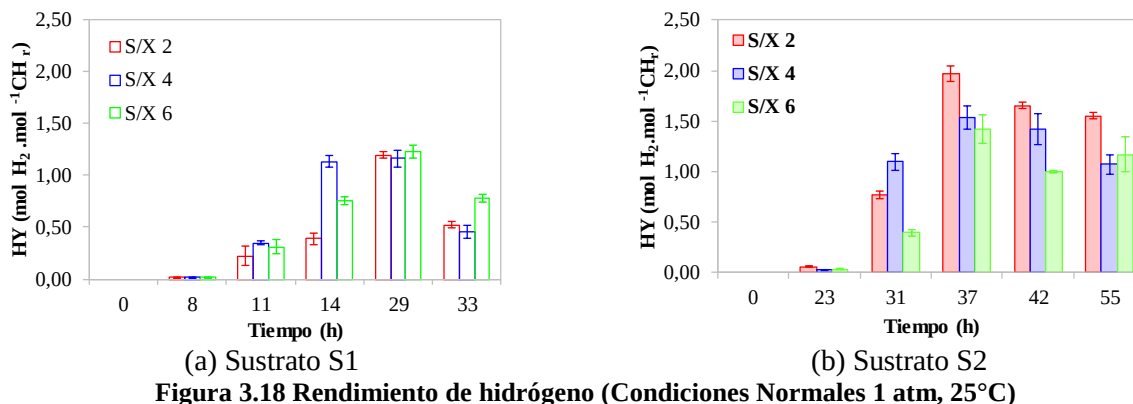
Aunque estudios recientes demuestran que es posible la producción de H_2 a pH inferior a 3,0 (Mota *et al.*, 2018), estos resultados ocurren bajo condiciones de flujo continuo donde no hay agotamiento de sustrato y por lo tanto, los microorganismos pueden suplir el gasto de energía adicional que supone el mantenimiento celular bajo condiciones adversas, sin sacrificar el crecimiento celular ni la producción de biogás.

Otro aspecto interesante del rendimiento de biogás, es que para el sustrato simple (S1) el rendimiento máximo no fue afectado significativamente por la relación S/X, obteniendo un valor máximo de 2,4, 2,5 y 2,3 $\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1} \text{CH}_r$ para S/X 2, 4 y 6 respectivamente (Figura 3.17 a). Mientras que con el sustrato complejo (S2) se observó una relación inversamente proporcional entre el máximo rendimiento de biogás y la relación S/X, siendo mejor el rendimiento con S/X 2, seguido de S/X 4 y por último S/X 6. Este

resultado es similar con lo expuesto por [Chen et al. \(2006\)](#) y [Lucas et al. \(2015\)](#) quienes afirman que existe una relación S/X para cada tipo de sustrato que mejora el rendimiento de H_2 ; en este caso la disminución de la relación S/X mejoró el rendimiento de biogás, lo cual podría asociarse tanto con un mejor aprovechamiento del sustrato, favorecido por el buen microambiente de amortiguación que benefició la fermentación como por el tipo de sustrato que pudo influir sobre las características metabólicas de los microorganismos.



Con relación al HY, en la Figura 3.18 se observa un comportamiento similar al presentado por el rendimiento de biogás (Figura 3.17). Esta similitud, permite validar para los ensayos de PBH, el método manométrico como una herramienta sencilla y de bajo costo, que complementada con análisis de cromatografía gaseosa, puede describir adecuadamente el proceso acumulativo de biogás e hidrógeno. El método manométrico que tradicionalmente ha sido empleado en los ensayos de PBM ([Fdz-Polanco et al., 2006](#)) recientemente ha sido empleado en estudios similares, orientados a la producción biológica de hidrógeno ([Marone et al., 2017](#)).



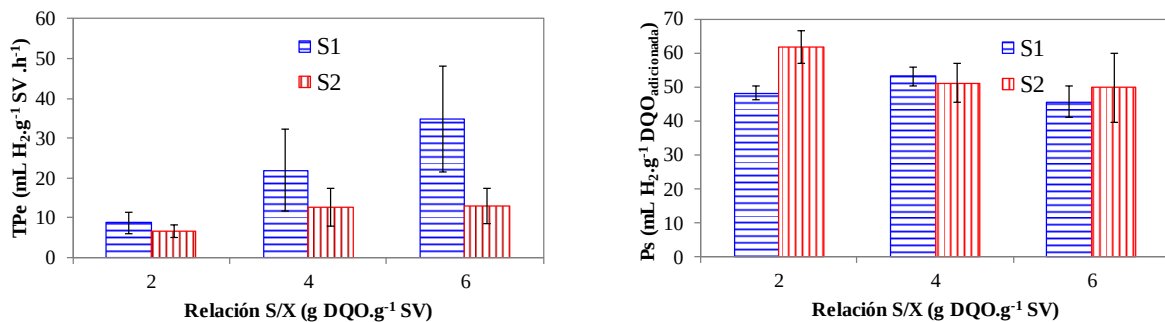
En general, el HY para S1 no fue afectado por la relación S/X, los valores máximos observados fueron 1,20, 1,17 y 1,25 mol H_2 ·mol⁻¹ CH₄ para la relación S/X 2, 4 y 6 respectivamente (Tabla 3.11); estos valores que son muy bajos al compararlos con el rendimiento teórico máximo de 8 mol H_2 ·mol⁻¹ CH₄ con ácido acético como único subproducto final o 4 mol H_2 ·mol⁻¹ CH₄ con ácido butírico como metabolito soluble producido ([Luo et al., 2010a](#)), permiten respaldar la tesis de que bajo condiciones adversas de pH los microorganismos gastan energía adicional para el mantenimiento celular y por lo tanto, es menor la energía liberada, en este caso representada en un bajo rendimiento de hidrógeno.

Tabla 3.11 Valores de los parámetros cinéticos del ajuste al modelo de Gompertz modificado y el efecto de la relación S/X sobre el rendimiento de hidrógeno

Parámetro	Sustrato					
	S1			S2		
	Relación S/X					
	2	4	6	2	4	6
Rm (mL.h ⁻¹)	10,21	12,20	12,86	7,64	7,32	4,72
P (mL)	107,58	121,82	105,38	134,25	114,64	112,64
λ (h)	11,59	6,48	14,54	19,88	23,40	23,16
Ajuste R ²	0,98	0,99	0,89	0,91	0,83	0,79
HY (mol H ₂ .mol ⁻¹ CH _r)	1,20	1,17	1,25	1,98	1,49	1,36

Por el contrario, el HY para S2 fue afectado significativamente por la relación S/X, presentando decrecimiento desde 1,98 hasta 1,36 mol H₂.mol⁻¹ CH₂ con el incremento en la relación S/X desde 2,0 hasta 6,0 g DQO.g⁻¹ SV, respectivamente. Un comportamiento similar fue observado por Reddy *et al.* (2017) usando como sustrato bagazo de caña solubilizado. El HY del presente estudio, es comparable con 1,72 mol.H₂.mol⁻¹ glucosa reportado por Wang *et al.* (2017b) usando como sustrato almidón de yuca.

Aunque la disminución del HY con incremento de la relación S/X puede ser causado por varios factores, Reddy *et al.* (2017) afirman que a mayor relación S/X los microorganismos solo pueden convertir la fracción soluble del sustrato en hidrógeno, debido a las etapas limitantes en los procesos de fermentación, entre las que se encuentra la hidrólisis. Este planteamiento permite aclarar las diferencias observadas entre el HY con S1 y S2 y es soportada en este estudio con los resultados de la tasa de producción específica (TPe) presentada en la Figura 3.19, la cual según Intanoo *et al.* (2014) es útil para indicar la capacidad de los microorganismos para producir hidrógeno a partir de compuestos orgánicos. En esa Figura se observa que para el sustrato S1, el cual es un sustrato simple de tipo soluble, la TPe se incrementó con el aumento de la relación S/X ($R^2 > 0,99$), es decir, que hubo una mayor utilización del sustrato por unidad de microorganismo, cuando se disminuyó la concentración de microorganismos debida al incremento en la relación S/X. Desde un punto de vista de escalamiento del proceso, este resultado es interesante porque implica menores requerimientos de biomasa para obtener el mismo HY, a partir de un sustrato simple.



(a) Tasa de producción específica

(b) Tasa específica de producción potencial

Figura 3.19 Tasa y producción específica de hidrógeno

Sin embargo, con un sustrato de mayor complejidad, como el sustrato S2, la TPe no presentó una correlación lineal con la relación S/X, la TPe para la relación S/X 4 y S/X 6 no fueron estadísticamente diferentes ($p > 0,05$), indicando de esta manera que entre la relación S/X 4 y S/X 6 la capacidad de los microorganismos para producir hidrógeno a partir del sustrato S2 fue afectada por una mayor disponibilidad de sustrato por unidad de microorganismos y, esa afectación fue expresada tanto en la disminución del

potencial de producción de hidrógeno específico (Figura 3.19 b) como por el decrecimiento en el HY (Figura 3.18b y Tabla 3.11).

Con los sustratos S1 y S2 los microorganismos presentaron diferentes tendencias en la tasa específica de producción potencial de hidrógeno (Ps) con relación a la variación de la relación S/X (Figura 3.19 b). Con S2 la Ps mostró una tendencia disminuir con el incremento de la relación S/X. De esta manera, la mayor Ps fue observada con S2 y la relación S/X 2 ($61,72 \text{ mL H}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{adicionada}}$), debido a que la Ps está relacionada con el tipo de sustrato y que sus propiedades condicionan los procesos metabólicos a través de los cuales los microorganismos extraen la energía y nutrientes contenidos en el sustrato es posible suponer que para usar el sustrato S2 los microorganismos necesitaron de procesos más complejos que les permitirán usar el ácido láctico romper los enlaces por lo que estos procesos pudieron ser favorecidos por la presencia de mayor biomasa inicial (menor relación S/X).

3.3 CONCLUSIONES PARCIALES DEL CAPÍTULO 3

Los pretratamientos térmico y químico presentaron un efecto inicial sobre las BCH, sin embargo, estos microorganismos pudieron recuperar sus actividades metabólicas debido a cambios en la disponibilidad de sustratos. La producción fermentativa de hidrógeno fue afectada únicamente por el pH inicial, entre 5,0 y 5,4 y no por la interacción con el tipo de pre-tratamiento. Sin embargo, el pretratamiento del inóculo fue necesario para retardar el efecto de las BCH. Debido a que los mayores rendimientos de hidrógeno fueron observados en la combinación Tco5.0 ($1,25 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ CH}$) seguido de la combinación Qco5.4 ($1,10 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ CH}$) se puede concluir que estas combinaciones son más las adecuadas tanto para pretratar el inóculo mixto establecer una condición de pH para la fermentación oscura del agua residual de proceso de extracción de almidón de yuca. Aunque no se pudo establecer una diferencia significativa entre los dos métodos de pretratamiento del inóculo, en esta investigación se seleccionó el pretratamiento térmico como el método más apropiado para eliminar las BCH en el inóculo mixto, teniendo en cuenta su simplicidad y rapidez, además que en combinación con un pH de fermentación entre 5,0 y 5,4 podría reducir los requerimientos de un alcalinizante

Para el sustrato simple S1, la relación S/X no influyó significativamente sobre el HY debido principalmente al efecto negativo de la reducción del pH ocasionado por la producción y acumulación de AGV. El incremento de la relación S/X con el sustrato S1 influyó sobre la Tasa de Producción Específica de Hidrógeno (TPe) mostrando que incluso con una relación S/X alta ($6,0 \text{ g DQO} \cdot \text{g}^{-1} \text{ SV}$) la tasa de utilización del sustrato por unidad de microorganismo no se afectó, conservando el acople entre los procesos catabólicos y anabólicos. Sin embargo, es importante resaltar que este resultado está fuertemente relacionado con las características del sustrato, así para el sustrato simple, la mejor TPe fue $34,73 \text{ mL H}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ SV} \cdot \text{h}^{-1}$ con la relación S/X $6,0 \text{ g DQO} \cdot \text{g}^{-1} \text{ SV}$.

Para el sustrato S2, la relación S/X influyó sobre el rendimiento de hidrógeno. El máximo rendimiento de hidrógeno de $1,98 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ CH}_r$ fue encontrado con la relación S/X $2,0 \text{ g DQO} \cdot \text{g}^{-1} \text{ SV}$ con una tasa de producción específica de hidrógeno de $6,60 \text{ mL H}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ SV} \cdot \text{h}^{-1}$. Inicialmente estos resultados sugieren que la producción biológica de hidrógeno a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca es factible, pero que a diferencia de un sustrato simple como la sacarosa, se requiere de una menor disponibilidad de sustrato por unidad de microorganismo (menor relación S/X) para extraer la energía contenida en el sustrato debido a que este tipo de sustrato, ya sea por su contenido de inicial de AGV o por los enlaces que presenta la materia orgánica, obliga a los microorganismos a utilizar una ruta metabólica en la cual pueda emplear el ácido láctico como cosustrato y a implementar una etapa hidrolítica que retrasa la fermentación y por lo tanto el uso de energía química (ATP) que no se transforma en hidrógeno. Por lo anterior, es posible que a través del control de la condiciones ambientales y operacionales se pueda mejorar

el rendimiento de hidrógeno a través de la fermentación oscura del sustrato S2. Entre esas variables se resalta la importancia de controlar el pH de la fermentación a través de un ambiente con la adecuada capacidad buffer que neutralice los AGV producidos y el control de la relación S/X para evitar el desacople entre el anabolismo y el catabolismo.

Finalmente, los resultados de esta investigación mostraron que el método manométrico representa una herramienta sencilla para el seguimiento de la producción acumulada de biogás en ensayos de PBH.

3.4 RECOMENDACIONES

Debido a la efectividad del método manométrico para seguir la evolución de la producción acumulada de biogás e hidrógeno, se recomienda en estudios de flujo discontinuo suspender perlas de NaOH en el *headspace* para atrapar el CO₂ y de esta manera, relacionar directamente la presión acumulada con la presión de hidrógeno, siempre que los análisis de cromatografía comprueben la ausencia de otros gases, tales como metano. Además, la eliminación de CO₂ en el gas podría inducir a la transferencia del CO₂ disuelto hacia la fase gaseosa y de esa manera, se contribuiría a eliminar la acetogénesis (consumo de H₂) debido a que este grupo de bacterias no son sensibles a los pretratamientos y, por lo tanto, su presencia podría causar el consumo de hidrógeno.

Se sugiere usar unidades experimentales de mayor tamaño que contribuyan a minimizar el error experimental, debido a que la concentración inicial del inóculo fue bastante alta se tuvo una dificultad mayor para cuantificar volúmenes de lodo entre 5 y 10 mL. Con unidades experimentales de 1 o 2 L se podría disminuir el error experimental al requerir mayores volúmenes de inóculo y con ello garantizar una mayor repetitividad entre las réplicas.

Debido a la rápida evolución de las curvas de presión acumulada en la producción fermentativa de hidrógeno, se recomienda integrar en estos estudios de flujo discontinuo mediciones en línea. Para preservar la aplicación de métodos económicos y de fácil adquisición se recomienda el uso sensores de H₂ de bajo costo como el MQ-8 que pueden ser programados con plataformas como Arduino que poseen un entorno de programación simple y código abierto. A través de un trabajo multidisciplinario este método puede acoplarse al método manométrico para recopilar mayor información en tiempo real en estudios orientados a la optimización de variables en la producción fermentativa de hidrógeno.

3.5 REFERENCIAS CAPÍTULO 3

- ABREU, A. A.; ALVES, J. I.; PEREIRA, M. A.; SOUSA, D. Z. & ALVES, M. M. (2011). Strategies to suppress hydrogen-consuming microorganisms affect macro and micro scale structure and microbiology of granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 108, 1766-75.
- APHA; AWWA & WEF (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, DC: American Public Health Association.
- AQUINO, S. & CHERNICHARO, C. (2005b). Volatile fatty acids (VFAs) accumulation in anaerobic reactors under stress: causes and control strategies (in Portuguese: Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle). *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 10, 152-161.
- BAKONYI, P.; NEMESTÓTHY, N.; SIMON, V. & BÉLAFI-BAKÓ, K. (2014). Review on the start-up experiences of continuous fermentative hydrogen producing bioreactors. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 40, 806-813.

- BARRIOS, J. (2015). *Influencia del ph sobre la producción biológica de hidrógeno a partir de agua residual agroindustrial*. Ingeniero Sanitario y Ambiental Pregrado, Universidad del Valle.
- BUITRON, G.; PRATO-GARCIA, D. & ZHANG, A. (2014). Biohydrogen production from tequila vinasses using a fixed bed reactor. *Water Sci Technol*, 70, 1919-25.
- 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, 3367-3372.
- CASTRO-VILLALOBOS, M. C.; GARCÍA-MORALES, J. L. & FERNÁNDEZ, F. J. (2012b). By-products inhibition effects on bio-hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 7077-7083.
- CHEN, S.; LEE, K.; LO, Y.; CHEN, W.; WU, J.; LIN, C. & CHANG, J. (2008a). Batch and continuous biohydrogen production from starch hydrolysate by *Clostridium* species. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1803-1812.
- CHEN, W.; CHEN, S.; KUMARKHANAL, S. & SUNG, S. (2006). Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 2170-2178.
- CHOU, C.; WANG, C.; HUANG, C. & LAY, J. (2008). Pilot study of the influence of stirring and pH on anaerobes converting high-solid organic wastes to hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1550-1558.
- 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. *Bioresour Technol*, 98, 1602-7.
- DAVILA-VAZQUEZ, G.; DE LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; ALATRISTE-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, 3174-3181.
- DEL NERY, V. (1987). *Utilização de lodo anaeróbico imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo*. Universidade de São Paulo.
- DILALLO, R. & ALBERTSON, O. E. (1961). Volatile acids by direct titration. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 356-365.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. & SMITH, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- FANG, H. H. & LIU, H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresour Technol*, 82, 87-93.
- FDZ-POLANCO, F.; NIETO, P.; PEREZ-ELVIRA, S. I. & FDZ-POLANCO, M. (2006). Automated manometric method to assess anaerobic toxicity of chemicals. *Water Sci Technol*, 54, 95-101.
- FERNÁNDEZ, F.; VILLASEÑOR, J. & INFANTES, D. (2011). Kinetic and stoichiometric modelling of acidogenic fermentation of glucose and fructose. *Biomass and Bioenergy*, 35, 3877-3883.
- GOMES, S. D.; FUESS, L. T.; MAÑUNGA, T.; FEITOSA DE LIMA GOMES, P. C. & 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, 8120-8131.
- GOUD, R. K.; SARKAR, O. & MOHAN, S. V. (2014). Regulation of biohydrogen production by heat-shock pretreatment facilitates selective enrichment of *Clostridium* sp. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, 7572-7586.

- GRAUSE, G.; IGARASHI, M.; KAMEDA, T. & YOSHIOKA, T. (2012). Lactic acid as a substrate for fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 16967-16973.
- GRIMMLER, C.; JANSSEN, H.; KRAUBE, D.; FISCHER, R.; BAHL, H.; DÜRRE, P.; LIEBL, W. & EHRENREICH, A. (2011). Genome-wide gene expression analysis of the switch between acidogenesis and solventogenesis in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 20, 1-15.
- GUYOT, J.; GUTIERREZ, G. & ROJAS, M. (1993). Anaerobic microbial counts of different potential anaerobic inocula. *Applied microbiology and biotechnology*, 40, 139-142.
- HALLENBECK, P. (2013). Chapter 2 - Fundamentals of Biohydrogen. In: LARROCHE, A. P.-S. C. C. H. (ed.) *Biohydrogen*. Amsterdam: Elsevier.
- HASAN, S. D.; GIONGO, C.; FIORESE, M. L.; GOMES, S. D.; FERRARI, T. C. & SAVOLDI, T. E. (2015). Volatile fatty acids production from anaerobic treatment of cassava waste water: effect of temperature and alkalinity. *Environ Technol*, 36, 2637-46.
- HAWKES, F.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. & HUSSY, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1339-1347.
- HERNÁNDEZ AVILÉS, D. M.; GRISALES PENAGOS, D. K.; TATIANA, A. & CHAPARRO, R. (2016). Effect of high rate anaerobic reactor configuration on hydrogen production: packed-bed and hybrid-UASB. *Revista ION*, 29, 27-36.
- HURTADO, M. & MUÑOZ, D. (2014). *Efecto del pre-tratamiento térmico de un inóculo en la producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura de glucosa*. Ingeniero Sanitario y Ambiental Pregrado, Universidad del Valle.
- INFANTES, D.; GONZÁLEZ, A.; VILLASEÑOR, J. & FERNÁNDEZ, F. (2011). Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 15595-15601.
- INFANTES, D.; GONZÁLEZ DEL CAMPO, A.; VILLASEÑOR, J. & FERNÁNDEZ, F. J. (2012). Kinetic model and study of the influence of pH, temperature and undissociated acids on acidogenic fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 66, 66-72.
- INTANOO, P.; RANGSANVIGIT, P.; MALAKUL, P. & CHAVADEJ, S. (2014). Optimization of separate hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) system under thermophilic operation. *Bioresource Technology*, 173, 256-265.
- JENKINS, S.; MORGAN, J. & SAWYER, C. (1983). Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 448-453.
- JUANG, C.-P.; WHANG, L.-M. & CHENG, H.-H. (2011). Evaluation of bioenergy recovery processes treating organic residues from ethanol fermentation process. *Bioresource technology*, 102, 5394-5399.
- KALYUZHNYI, S. V. (1997). Batch anaerobic digestion of glucose and its mathematical modeling. II. Description, verification and application of model. *Bioresource Technology*, 59, 249-258.
- KANNAIAH, R.; SARKAR, O. & VENKATA, S. (2013). Regulation of biohydrogen production by heat-shock pretreatment facilitates selective enrichment of *Clostridium* sp. *International Journal of Hydrogen Energy*.
- KHANAL, S. (2003). Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 1123-1131.

- KIM, T. H.; LEE, Y.; CHANG, K. H. & HWANG, S. J. (2012b). Effects of initial lactic acid concentration, HRTs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. *Bioresour Technol*, 103, 136-41.
- LEE, Z. K.; LI, S. L.; KUO, P. C.; CHEN, I. C.; TIEN, Y. M.; HUANG, Y. J.; CHUANG, C. P.; WONG, S. C. & CHENG, S. S. (2010). Thermophilic bio-energy process study on hydrogen fermentation with vegetable kitchen waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 13458-13466.
- LIU, G. & SHEN, J. (2004). Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98, 251-256.
- LIU, Y. (1996). Bioenergetic interpretation on the S0X0 ratio in substrate-sufficient batch culture. *Water Research*, 30, 2766-2770.
- LUCAS, S. D. M.; PEIXOTO, G.; MOCKAITIS, G.; ZAIAT, M. & GOMES, S. D. (2015). Energy recovery from agro-industrial wastewaters through biohydrogen production: Kinetic evaluation and technological feasibility. *Renewable Energy*, 75, 496-504.
- LUO, G.; XIE, L.; ZOU, Z.; WANG, W. & ZHOU, Q. (2010a). Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. *Bioresour Technol*, 101, 959-64.
- LUO, G.; XIE, L.; ZOU, Z.; ZHOU, Q. & WANG, J. (2010b). Fermentative hydrogen production from cassava stillage by mixed anaerobic microflora: Effects of temperature and pH. *Applied Energy*, 87, 3710-3717.
- MARONE, A.; AYALA-CAMPOS, O. R.; TRABLY, E.; CARMONA-MARTINEZ, A. A.; MOSCOVIZ, R.; LATRILLE, E.; STEYER, J.-P.; ALCARAZ-GONZALEZ, V. & BERNET, N. (2017). Coupling dark fermentation and microbial electrolysis to enhance bio-hydrogen production from agro-industrial wastewaters and by-products in a bio-refinery framework. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 1609-1621.
- MASSET, J.; HILIGSMANN, S.; HAMILTON, C.; BECKERS, L.; FRANCK, F. & THONART, P. (2010). Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009. *International journal of hydrogen energy*, 35, 3371-3378.
- MATSUMOTO, M. & NISHIMURA, Y. (2007). Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. *Journal of bioscience and bioengineering*, 103, 236-241.
- MOHD, N.; RAHMAN, N.; MAN, H.; MOHD, M. & HASSAN, M. (2011). Microbial characterization of hydrogen-producing bacteria in fermented food waste at different pH values. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 9571-9580.
- MOTA, V. T.; FERRAZ JUNIOR, A. D. N.; TRABLY, E. & ZAIAT, M. (2018). Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible? *Water Res*, 128, 350-361.
- NAKHLA, G.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A.; REID, G. & BAGHCHEHSARAEI, B. (2008). The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4064-4073.
- NASR, N.; ELBESHBISHY, E.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G. & EL NAGGAR, M. H. (2011). Bio-hydrogen production from thin stillage using conventional and acclimatized anaerobic digester sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 12761-12769.
- NORLI, I.; HO, Y.; FISCHER, K.; KRANERT, M. & BOLEY, A. (Year) Published. Biodegradability Assessment of Bio-flocculant via Anaerobic and Aerobic Test. International Conference on Environment Science and Engineering (ICESE), Bali, Indonesia, 2011.

- 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, 3409-3416.
- OHNISHI, A.; BANDO, Y.; FUJIMOTO, N. & SUZUKI, M. (2010). Development of a simple biohydrogen production system through dark fermentation by using unique microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 8544-8553.
- PAKARINEN, O.; LEHTOMÄKI, A. & RINTALA, J. (2008). Batch dark fermentative hydrogen production from grass silage: the effect of inoculum, pH, temperature and VS ratio. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 594-601.
- PAVLOSTATHIS, S. (2011). Kinetics and Modeling of Anaerobic Treatment and Biotransformation Processes. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. Burlington: Academic Press.
- PENTEADO, E.; LAZARO, C.; SAKAMOTO, I. & ZAIAT, M. (2013). Influence of seed sludge and pretreatment method on hydrogen production in packed-bed anaerobic reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 6137-6145.
- 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, 398-404.
- RAMÍREZ, L. (1998). Adecuación de una metodología para la evaluación de potenciales semillas para la inoculación de reactores anaerobios. Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle. Cali, Colombia. Disponible en: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=93199&indexSearch=ID#refine>.
- REDDY, K.; NASR, M.; KUMARI, S.; KUMAR, S.; GUPTA, S. K.; ENITAN, A. M. & BUX, F. (2017). Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate: effects of pH, S/X, Fe 2+, and magnetite nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 8790-8804.
- REGINATTO, V.; LAMAISSON, F. D. C.; AMANTE, E. R. & ANTÔNIO, R. V. (2011). METHODS: Long-term effect of nutrient supplementation of cassava wastewater on biohydrogen production by mixed culture. *Industrial Biotechnology*, 7, 143-150.
- ROJAS-CHACÓN, O. (1999). *Evaluación del comportamiento de tres sistemas de tratamiento anaerobia para la depuración de las aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca*. Maestría, Universidad del Valle.
- 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.
- SARATALE, G.; SARATALE, R. & CHANG, J. (2013). Chapter 9 - Biohydrogen from Renewable Resources. In: LARROCHE, A. P.-S. C. C. H. (ed.) *Biohydrogen*. Amsterdam: Elsevier.
- SCHNEIDERS, D.; DA SILVA, J. D.; TILL, A.; LAPA, K. R. & PINHEIRO, A. (2013). Specific and Methanogenic Activity (SMA) of industrial sludge from aerobic and anaerobic biological treatment (in Portuguese: Atividade metanogênica e específica (AME) de lodos industriais provenientes do tratamento biológico aeróbio e anaeróbio). *Revista ambiente & água-An interdisciplinary journal of applied science*, 8.
- SIQUEIRA, A. A.; DE CARVALHO, P. G. S.; MENDES, M. L. M. & SHIOSAKI, R. K. (2014). MicroFit: um software gratuito para desenvolvimento e ajuste de modelos matemáticos de crescimento bacteriano/MicroFit: a free software for the development and fit of mathematical models for bacterial growth. *Brazilian Journal of Food Technology*, 17, 329.

- SITTIJUNDA, S.; REUNGSANG, A. & SOMPONG, O.-T. (2010). Biohydrogen production from dual digestion pretreatment of poultry slaughterhouse sludge by anaerobic self-fermentation. *International journal of hydrogen energy*, 35, 13427-13434.
- STAVROPOULOS, K. P.; KOPSAHELIS, A.; ZAFIRI, C. & KORNAROS, M. (2016). Effect of pH on Continuous Biohydrogen Production from End-of-Life Dairy Products (EoL-DPs) via Dark Fermentation. *Waste and Biomass Valorization*, 7, 753-764.
- TORQUATO, L. D. M.; PACHIEGA, R.; CRESPI, M. S.; NESPECA, M. G.; DE OLIVEIRA, J. E. & MAINTINGUER, S. I. (2017). Potential of biohydrogen production from effluents of citrus processing industry using anaerobic bacteria from sewage sludge. *Waste Manag*, 59, 181-193.
- TORRES, D. G. B.; LUCAS, S. D. M.; ANDREANI, C. L.; CARVALHO, K. Q. D.; 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, 160-172.
- TORRES, P. & PÉREZ, A. (2010). Specific methanogenic activity: a tool for control and optimization of anaerobic wastewater treatment system (in Spanish: 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.
- TORRES, P.; PEREZ, A.; CAJIGAS, Á.; OTERO, A. & GONZÁLEZ, M. (2008). Selection of chemical conditioners for cassava wastewater anaerobic treatment (in Spanish: Selección de acondicionadores químicos para el tratamiento anaerobio de aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca). *Ingeniería de recursos naturales y del ambiente*, 66-74.
- TRAD, Z.; AKIMBOMI, J.; VIAL, C.; LARROCHE, C.; TAHERZADEH, M. J. & FONTAINE, J.-P. (2015). Development of a submerged anaerobic membrane bioreactor for concurrent extraction of volatile fatty acids and biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 196, 290-300.
- TREVISAN, V. (2010). *Proposta de metodologia para determinação da atividade hidrogênica específica*. Doutor em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- VENKATA MOHAN, S. (2009). Harnessing of biohydrogen from wastewater treatment using mixed fermentative consortia: Process evaluation towards optimization. *International journal of hydrogen energy*, 34, 7460-7474.
- WANG, J. & WAN, W. (2008). Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *International journal of hydrogen energy*, 33, 2934-2941.
- WANG, S.; MA, Z.; ZHANG, T.; BAO, M. & SU, H. (2017b). Optimization and modeling of biohydrogen production by mixed bacterial cultures from raw cassava starch. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 11, 100-106.
- WINSOR, C. P. (1932). The Gompertz curve as a growth curve. *Proceedings of the national academy of sciences*, 18, 1-8.
- WU, C. W.; WHANG, L. M.; CHENG, H. H. & CHAN, K. C. (2012). Fermentative biohydrogen production from lactate and acetate. *Bioresour Technol*, 113, 30-6.
- XIAO, B.; HAN, Y. & LIU, J. (2010). Evaluation of biohydrogen production from glucose and protein at neutral initial pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 6152-6160.
- ZHANG, T.; LIU, H. & FANG, H. H. (2003). Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *J Environ Manage*, 69, 149-56.

Capítulo 4 Influencia de la orgánica volumétrica (COVe) sobre la producción fermentativa de hidrógeno

Diversos estudios han identificado que el crecimiento excesivo de la biomasa es un factor limitante para el HY durante la fermentación oscura, debido a que el aumento en la biomasa modifica continuamente la relación alimento/microorganismo provocando una competencia por el sustrato. De esta manera, los estudios que se enfocan en este tema sugieren que mantener una concentración constante de biomasa podría incentivar el HY. La carga orgánica volumétrica específica (COVe) puede ser entendida como una variable que expresa la habilidad de los microorganismos para producir hidrógeno a partir de un determinado sustrato, es decir, que está fuertemente ligada con la relación alimento/microorganismo.

Actualmente, no hay una conclusión satisfactoria con relación al efecto de la COVe sobre la producción fermentativa de hidrógeno, los estudios relacionados indican que es posible que exista un rango adecuado en el cual el HY sea optimizado a través del control de esta variable. Sin embargo, ese rango puede estar influenciado por el tipo de sustrato debido a su dependencia con la relación alimento/microorganismo. Adicionalmente, su determinación y control dependen ampliamente del tipo de reactor. Por ejemplo, en reactores de crecimiento adherido, el control de la biomasa implica un gran desafío debido a la dificultad que representa su cuantificación. Es por eso que los estudios que involucran este tipo de reactores en su mayoría, determinan los valores de la COVe al final del periodo de evaluación. Por el contrario, en reactores de crecimiento suspendido o auto-inmovilizado la determinación del contenido de biomasa se facilita. Sin embargo, en este tipo de reactores se pierde la ventaja que ofrecen los reactores de crecimiento adherido, relacionada con el desacople entre el tiempo de retención hidráulico (TRH) y el tiempo de retención celular. Para compensar ese desbalance, los reactores de crecimiento suspendido son operados con TRH relativamente altos, comúnmente entre 6 y 12 h, para evitar la pérdida de biomasa causada por un efecto de lavado derivado de las altas velocidades de flujo que se relacionan con TRH muy bajos (menores a 4 h).

Encontrar un balance entre la COVe y el HY usando reactores anaerobios de crecimiento suspendido, resultaría de gran interés para incrementar la aplicación de este tipo de reactores en la producción biológica de hidrógeno. Toda vez que reactores anaerobios completamente mezclados (CSTR por sus siglas en ingles) y UASB (tradicionales e híbridos) que se caracterizan porque el crecimiento de la biomasa es de tipo suspendido o auto-inmovilizado, han sido aplicados con éxito en la producción biológica de hidrógeno. Además, el uso de un sustrato real que ha mostrado su potencial aplicación en este proceso, contribuye en la identificación del efecto del sustrato sobre la el HY y sus implicaciones sobre el control de la COVe.

Por lo anterior, se diseñó una matriz experimental que involucró el uso un sustrato real y dos prototipos a escala de laboratorio, operados en tres diferentes condiciones de COVe, con el objetivo de evaluar la influencia de la COVe sobre el HY a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca en condiciones de flujo continuo. Los resultados de esta investigación son presentados en este capítulo que está dividido en Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Recomendaciones y Bibliografía. En la sección de materiales y métodos se detalla todo el procedimiento experimental, la recolección y el procesamiento de datos, así como el análisis estadístico. En la sección de resultados y discusión se aborda el análisis del efecto de la COVe sobre las variables de productividad, tales como composición del biogás, rendimiento, tasa de producción volumétrica y tasa de producción específica, y el análisis de las variables de desempeño relacionadas con la fase líquida. Finalmente, se presentan las conclusiones y se proponen algunas recomendaciones para estudios futuros.

4.1 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1 SUSTRATO

Se utilizó como único sustrato y fuente de carbono, agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, denominado en el Capítulo 3 con la sigla S2. El sustrato fue preparado en el laboratorio aplicando el método descrito previamente en el Capítulo 3. Para suplir la demanda de agua residual durante esta etapa, se procesaron aproximadamente 150 kg raíces de yuca/semana. Debido al elevado volumen de yuca para procesar, se reemplazó el rallado manual por un licuado con una licuadora industrial M-CB 15 empleando una relación 1:1,6 (w/v) que permitió lograr el mismo efecto en la preparación del agua residual en menor tiempo, un procedimiento similar fue reportado por [Cappelletti et al. \(2011\)](#).

Previo a la alimentación del reactor, se estandarizó la concentración de carbohidratos totales (CH) en el sustrato hasta un valor promedio de 1.750 mg.L⁻¹. Las principales características fisicoquímicas del sustrato se presentan en la Tabla 4.1, las cuales fueron semejantes al agua residual derivada de las rallanderías ubicadas al norte del Departamento del Cauca (Colombia) ([Colin et al., 2007](#)).

Tabla 4.1 Características fisicoquímicas el sustrato

Parámetro fisicoquímico	Unidades	Valor	Máximo	Mínimo	Número de datos	Métodos analíticos
pH	-	5,26 ± 0,52	4,29	6,91	199	APHA et al. (2005)
Nitrógeno Amoniacal Total (NAT)	mg N-NH ₃ .L ⁻¹	86,68 ± 70,19	387,37	13,64	190	
Orto-Fosfato	mg PO ₄ ⁻³ .L ⁻¹	175,64 ± 168,42	1.159,86	2,34	192	
SST	mg.L ⁻¹	7.725,98 ± 2.500,97	15.023,26	3.296,00	194	
DQO (total)	mg.L ⁻¹	8.857,07 ± 2.982,74	17.805,56	1.662,85	195	
Alcalinidad Total (AT)	mg CaCO ₃ .L ⁻¹	374,04 ± 239,73	1.212,78	10,97	194	Adaptando el método descrito por DiLallo y Albertson (1961)
Alcalinidad Bicarbonática (AB)		1,68 ± 16,51	163,49	0,00	195	
Ácidos grasos volátiles totales (AGV)	mg A.acetico.L ⁻¹	1.365,04 ± 522,90	3.091,28	264,10	196	
Carbohidratos Totales	mg CH.L ⁻¹	1.750,10 ± 203,77	2.627,11	1.091,97	198	DuBois et al. (1956)
Relación DQO:N:P	-	350:3,25:6,67	350:10,97:47,58	350:0,90:0,11	220	

4.1.2 INÓCULO Y ACLIMATACIÓN

4.1.2.1 Aclimatación

El inóculo y el proceso de aclimatación progresiva fueron similares a los utilizados en la etapa anterior (Capítulo 3). Para la aclimatación se empleó un recipiente cerrado de 5,0 L protegido de la luz solar

o artificial; dentro de este recipiente se puso en contacto el inóculo con una mezcla de sustratos compuesta por agua residual del centro de sacrificio de ganado y agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, con un volumen de 3,0 L de lodo (equivalente al 60% del volumen útil del recipiente) y una mezcla de sustratos de 2,0 L (equivalente al 40% del volumen útil del recipiente). En la Figura 4.1 se ilustra la aclimatación del inóculo. Al inicio de la aclimatación fue mayor la proporción de agua residual del centro sacrificio de ganado, y a medida que avanzó la aclimatación, se incrementó el volumen del otro sustrato.

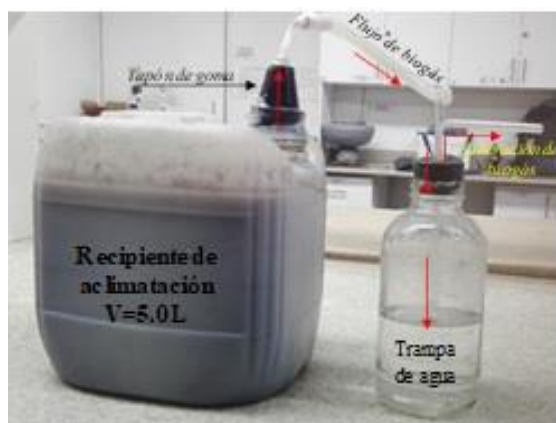


Figura 4.1 Aclimatación del inóculo

Durante la aclimatación, el pH de la mezcla (lodo: sustrato) se mantuvo naturalmente en un intervalo entre 6,0 y 6,5, esta condición ayudó a establecer unas condiciones ambientales más adecuadas para la preselección de microorganismos productores de hidrógeno y evitó la adición de alcalinizantes o acidificantes durante este proceso. La aclimatación tuvo una duración de 6 días y para reemplazar la mezcla de sustratos se aceptaron reducciones de la DQO_{Total} superiores a 60%. En la Tabla 4.2 se presentan las proporciones de los sustratos y la reducción de DQO obtenidas durante la aclimatación

Tabla 4.2 Aclimatación del inóculo

Dia	Relación entre AR del centro de sacrificio de ganado y agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca (%)	DQO (mg.L ⁻¹)		Reducción de DQO (%)
		inicial	final	
1	80/20	2.052	14	99
3	60/40	2.060	27	99
4	40/60	3.060	279	91
5	20/80	3.835	277	93
6	0/100	4.777	279	94

Finalizada la aclimatación, se determinó la AME del inóculo aclimatado mediante el método descrito por [Field et al. \(1988\)](#) ajustado por [Torres y Pérez \(2010\)](#), el cual se fundamenta en medir diariamente el metano que se produce al colocar en un botella una cantidad conocida de inóculo, en presencia de una mezcla de AGV, a 35°C y en condiciones nutricionales establecidas. El valor de AME se calculó obteniendo la máxima pendiente de la curva de producción de metano en función del tiempo, incorporada en la Ecuación 4.1

$$AME = \frac{R \times 24}{FC \times V \times SV} \left[\frac{g DQO_{CH_4}}{g SV \times d} \right] \quad \text{Ecuación 4.1}$$

En la cual:

R: Velocidad de producción de metano (mL CH₄.d⁻¹)

V: Volumen útil de la botella (L)

SV: Concentración de inóculo en la botella (g SV.L⁻¹)

24: Factor de conversión (h.d⁻¹)

FC: Factor de conversión (mL CH₄.g⁻¹ DQO)

En la Tabla 4.3 se presentan las principales características fisicoquímicas del inóculo aclimatado. De acuerdo con [Field *et al.* \(1988\)](#), [López Torres *et al.* \(2004\)](#) y [\(Machado *et al.*, 2016\)](#) lodos anaerobios con AME entre 0,02 a 0,20 g DQO-CH₄.g⁻¹ SV.d⁻¹ denotan una buena actividad metanogénica y por lo tanto, son apropiados para uso como inóculos en reactores anaerobios, debido a que el inóculo aclimatado presentó AME superior a este rango, se puede ratificar su potencial para uso en procesos de DA. Sin embargo, para el interés de la producción biológica de hidrógeno por fermentación oscura, su alta AME expresa la necesidad de someter el inóculo aclimatado a algún pretratamiento para eliminar la presencia de arqueas metanogénicas relacionadas con el consumo de hidrógeno.

Tabla 4.3 Características fisicoquímicas del inóculo aclimatado y pretratado

Parámetro fisicoquímico	Unidades	Inóculo		Métodos analíticos
		Aclimatado	Pretratado	
pH	-	6,16	6,67	APHA <i>et al.</i> (2005)
ST	g.L ⁻¹	76,5	74,6	
SV	g.L ⁻¹	60,1	59,9	
AME	g DQO-CH ₄ .g ⁻¹ SV ⁻¹ .d ⁻¹	0,286 ± 0,015	0,0	Field <i>et al.</i> (1988) , Torres y Pérez (2010)

4.1.2.2 Pretratamiento del inóculo aclimatado

Una porción del inóculo aclimatado fue sometido a un pretratamiento térmico, tal como se ilustra en la Figura 4.2. Este método fue seleccionado en función de los resultados observados en el Capítulo 3. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre el pretratamiento térmico y químico, se adoptó el pretratamiento térmico como metodología para inhibir la presencia bacterias consumidoras de hidrógeno (BCH) y favorecer la esporulación de bacterias productoras de hidrógeno (BPH) debido a que este método, de acuerdo con [Goud *et al.* \(2014\)](#) proporciona mayor estabilidad del inóculo frente al recrecimiento de BCH. A través de pruebas preliminares realizados por [Hurtado y Muñoz \(2014\)](#) y [Barrios \(2015\)](#) se ajustó la intensidad de la temperatura para el pretratamiento térmico hasta un valor de 85°C con tiempo de exposición mínima de 30 min, estas condiciones fueron similares a las recomendadas por [Nakhla *et al.* \(2008\)](#) y [Mohd *et al.* \(2011\)](#).

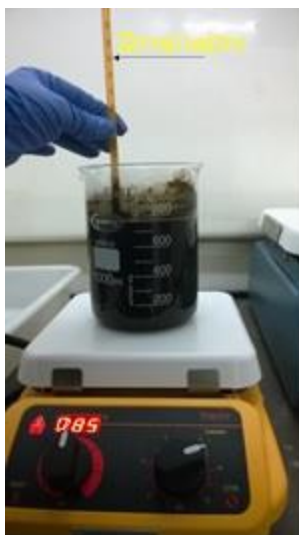


Figura 4.2 Pretratamiento térmico del inóculo

El choque térmico se realizó a través de una plancha de agitación con calentamiento continuo, que permitió exponer homogéneamente el inóculo aclimatado a la misma temperatura. A través de un termómetro de mercurio constantemente fue registrada la temperatura de la mezcla. Una vez que la mezcla alcanzó la temperatura deseada (85°C) se inició el registro del tiempo de exposición y se controló la temperatura aceptando desviaciones de 0,2 °C. Finalizado el pretratamiento, el inóculo se dejó en reposo a temperatura ambiente y luego se caracterizó de acuerdo con las variables presentadas en la Tabla 4.3, en la cual se observa que el pretratamiento térmico fue un método efectivo para inhibir la actividad de BCH debido a que el inóculo pretratado no presentó AME.

4.1.3 UNIDAD EXPERIMENTAL

Como unidad experimental se utilizaron dos reactores de características similares, contruidos en acrílico (espesor 4mm). El cuerpo de cada reactor se dividió en cinco zonas: (1) zona de entrada ubicada en la parte inferior, en esta zona también se instaló un sistema de purga de lodo, luego de forma ascendente se localizó la zona de mezcla o reacción (2) que estaba comunicada con una zona de sedimentación, tipo campana invertida (3), después una zona de salida del efluente (4) y finalmente, en la parte superior se instaló una zona para acumulación de biogás (5), denominada “*headspace*”. Entre la parte media de la zona de reacción y la zona de entrada, se instaló un sistema de recirculación tanto para mantener la biomasa expandida y mezclada, como para evitar su sedimentación en la zona de entrada.

A lo largo de todo el reactor, entre la zona de entrada y la zona de salida se distribuyeron diez válvulas para tomar muestras a diferentes alturas, identificadas como H_n ($n=0, 1, \dots, 9$); H_0 corresponde con la salida del efluente y H_9 con la entrada del afluente. La biomasa en el reactor se expandió desde la entrada (H_9) hasta H_3 , donde se conectó la bomba de recirculación, de esta manera la biomasa ocupó el 28 y 26% del volumen útil de reactor RA1 y RA2 respectivamente. La expansión de biomasa se controló a través del caudal de recirculación.

Por su configuración y funcionamiento hidráulico, las unidades experimentales se asemejan a los reactores anaerobios de manto expandido y crecimiento suspendido. En la Figura 4.3 se presenta un esquema del RA.

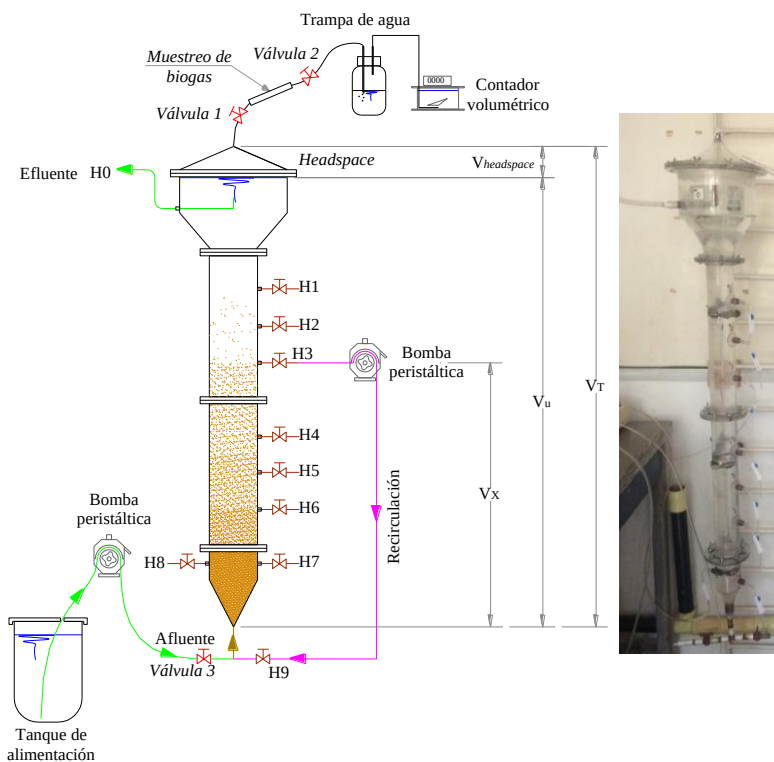


Figura 4.3 Esquema de la unidad experimental - Reactor acidogénico

V_x : volumen de lodo; V_u : volumen útil; V_T Volumen total; $V_{headspace}$: volumen de para acumulación de biogás

En la Tabla 4.4 se presentan las dimensiones de cada reactor, denominados reactor acidogénico 1 y 2 (RA 1 y RA 2).

Tabla 4.4 Características de los reactores acidogénicos

Parámetros	Unidades	Dimensiones	
		RA 1	RA 2
Volumen total - (V_T)	L	8,09	8,57
Volumen útil - (V_u)	L	7,31	7,85
Volumen <i>headspace</i>	L	0,78	0,72
Volumen de la zona de lodo (entre H9 y H3) – V_x	L	2,04	2,04
Diámetro interno	mm	64	64
Altura total	m	1,26	1,26

4.1.4 SEGUIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS

Para realizar el conteo de biogás, el *headspace* se conectó a través de una manguera de silicona con una trampa de agua, que permitió presurizar el reactor y determinar cualitativamente la producción de biogás. Se instaló un contador volumétrico para registrar cuantitativamente el volumen de biogás producido. Se utilizaron dos contadores, identificados como C1 y C2, construidos en el laboratorio con acrílico (espesor 4 mm) y dotados de un registrador magnético, estos contadores fueron continuamente calibrados. El registro del contador se realizaba en intervalos de 24 h aproximadamente, acompañados del registro de temperatura ambiente. Una vez registrado el volumen de biogás se reiniciaban los contadores. En la Figura 4.4 se presentan los contadores volumétricos de biogás y en la Tabla 4.5, sus dimensiones



Figura 4.4 Contador volumétrico de biogás

Tabla 4.5 Dimensiones de los contadores volumétricos de biogás

Parámetros de diseño	Unidades	Contador - C1	Contador -C2
Volumen de lectura por conteo	mL	2,0	8,5
Perdida hidráulica	cm	4	14
Altura	cm	10	15
Tipo	-	Circular	Rectangular

4.1.4.1 Extracción del biogás

Antes de extraer las muestras de biogás se registraba el conteo de biogás y se cerraba la válvula 2. Luego, con una jeringa de 5 mL acoplada a una válvula de tres vías, se extraía el biogás y se almacenaba en viales al vacío para su posterior análisis. Después se reiniciaba el contador de biogás y se esperaba que transcurrieran entre 30 y 45 min para abrir nuevamente la válvula 2, de esta manera se evitaba que la extracción de biogás interfiriera con el conteo del mismo.

4.1.5 DESCRIPCIÓN DEL ARREGLO EXPERIMENTAL

4.1.5.1 Carga Orgánica Volumétrica Específica (COVe)

El efecto COVe sobre la producción de hidrógeno se evaluó en tres niveles, los valores de cada COVe se presentan en la Tabla 4.6, expresados en términos de $\text{g CH} \cdot \text{g}^{-1} \text{SV} \cdot \text{d}^{-1}$ e identificados como *COVe0,8*, *COVe1,5* y *COVe3,1*. Estos valores fueron seleccionados en el rango entre 0,5 y 3,5 $\text{g CH} \cdot \text{g}^{-1} \text{SV} \cdot \text{d}^{-1}$ tomando en consideración los resultados del experimento E2 presentados previamente en el Capítulo 3, los cuales permitieron concluir que el HY a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca se mejora con una relación S/X entre 2 y 4 $\text{g DQO} \cdot \text{g}^{-1} \text{SV}$, que expresada en $\text{g CH} \cdot \text{g}^{-1} \text{SV}$ corresponden a 0,5 y 1,5, respectivamente. Adicionalmente, se tuvieron en cuenta los resultados de [Anzola-Rojas et al. \(2015\)](#) quienes recomiendan una COVe de 6,0 $\text{g sacarosa} \cdot \text{g}^{-1} \text{SV} \cdot \text{d}^{-1}$ para mantener la estabilidad del sistema en un reactor de crecimiento adherido, alimentado con un sustrato sintético. Debido a que en este estudio se utilizó un reactor acidogénico de medio suspendido fue necesario acotar el rango de COVe hasta un valor máximo de 3,1 $\text{g CH} \cdot \text{g}^{-1} \text{SV}$, para evitar el lavado o pérdida de la biomasa causado por el funcionamiento hidráulico del reactor. También se tuvieron en cuenta las recomendaciones de [Hafez et al. \(2010b\)](#) quienes sugieren una COVe entre 4,4 y 6,4 $\text{g DQO} \cdot \text{g}^{-1} \text{SV} \cdot \text{d}^{-1}$ para mantener un balance adecuado entre el rendimiento de hidrógeno y el rendimiento de biomasa.

Tabla 4.6 COVe evaluadas

Nivel	COVe (mg CH.g ⁻¹ SV.d ⁻¹)	ID	RA
1	0,8 ± 0,3	COVe0,8	RA1
2	1,5 ± 0,4	COVe1,5	RA1
3	3,1 ± 0,8	COVe3,1	RA2

4.1.5.2 Definición de condiciones de operación del RA

Para establecer y comparar estadísticamente el efecto de la COVe sobre la producción biológica de hidrógeno, se fijaron las condiciones iniciales de la concentración de sustrato (en términos de CH), del pH y del TRH, debido a que estas variables influyen significativamente sobre la producción biológica de hidrógeno.

Se estableció una concentración constante de carbohidratos totales en el afluente de 1.750 mg CH.L⁻¹, este valor es similar al valor medio observado en los efluentes de diferentes rallanderías ubicadas al norte del Departamento del Cauca (Colombia). Con relación al pH de operación se definió un valor de $5,2 \pm 0,2$, valor establecido en función de los resultados del experimento E1 presentados previamente en el Capítulo 3, los cuales permitieron concluir que el rendimiento de hidrógeno a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca se mejora con un pH inicial entre 5,0 y 5,4.

A través de ensayos preliminares en los cuales se disminuyó gradualmente el TRH entre 12 y 2 h con la COVe más crítica (3,1 g CH. g⁻¹ SV.d⁻¹) por su bajo contenido de biomasa, se definió que un TRH de 10 h era un valor apropiado para la operación del RA. Para

valores inferiores a 8 h se perdía más del 60% de la biomasa inicial en menos de 24 h, causada por las velocidades de flujo. TRH semejantes han sido aplicados por [Gavala et al. \(2006\)](#) y [Rosa et al. \(2014a\)](#).

4.1.6 INOCULACIÓN Y ARRANQUE DEL REACTOR ACIDOGÉNICO

Una vez establecidas las condiciones iniciales de operación en flujo continuo se procedió a inocular los reactores. La evaluación de la COVe se realizó aleatoriamente, primero se evaluaron la COVe1,5 y COVe3,1 en los RA1 y RA 2, respectivamente y finalmente, la COVe0,8 en el RA1. La inoculación consistió en introducir un volumen específico de lodo aclimatado-pretratado dentro del reactor y completar el volumen útil del reactor con el sustrato. Para cada inoculación se preparó un volumen adecuado del sustrato, al cual se le ajustó el pH hasta $5,2 \pm 0,2$, mediante la adición de fosfato de sodio (Na₂HPO₄) disuelto en agua destilada. De acuerdo con [Davila-Vazquez et al. \(2011\)](#), el buffer de fosfatos no reacciona con los AGV que se forman durante la fermentación oscura y favorece una mayor producción de hidrógeno en comparación con el buffer de bicarbonato. La cantidad de fosfato adicionada varió en función del pH inicial que presentaba el sustrato. Sin embargo, durante la operación del RA la adición del fosfato se realizó en función del pH del efluente para evitar la sobredosificación de esta sustancia.

Conociendo todos los parámetros de la Ecuación 4.2, se despejó y calculó la concentración de biomasa (X_{lodo}) requerida para cada COVe. A partir de la concentración de SV del lodo aclimatado-pretratado y con el volumen de la zona de lodo ($V_x = 2,04$ L) se calculó el volumen de inóculo adicionado para cada COVe. Los resultados se presentan en la Tabla 4.7. En todos los casos los valores fueron afectados por un factor de seguridad de 1,2 para compensar la pérdida inicial de biomasa durante la fase de arranque.

$$COVe = \frac{Q \times 24 \times C}{V_X \times X_{lodo}} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

En la cual,

COVe: Carga orgánica volumétrica específica (g CH. g⁻¹ SV.d⁻¹)

Q: Caudal de operación (L.h⁻¹)

24: Factor de conversión (h.d⁻¹)

C: Concentración de carbohidratos totales en el afluente (g CH.L⁻¹)

V_x: Volumen del reactor comprendido entre H9 y H3 ocupado por el lodo expandido (L)

X_{lodo}: Concentración de biomasa deseada en V_x (g SV. L⁻¹)

Tabla 4.7 Caracterización fisicoquímica del inóculo aclimatado-pretratado

Parámetros	Unidad	COVe (g CH. g ⁻¹ SV.d ⁻¹)		
		0,8	1,5	3,1
Caudal (Q)	L.h ⁻¹	0,73	0,73	0,79
Concentración del inóculo pretratado	g SV.L ⁻¹	50,82	67,04	67,04
Volumen de inóculo adicionado	L	1,41	0,90	0,18

Después de establecer el volumen del inóculo aclimatado-pretratado, este se mezcló con una porción del sustrato y se introdujo al reactor utilizando tanto la bomba de recirculación como la bomba de alimentación; cuando se llenó el reactor hasta la altura H3, se completó el volumen faltante con el sustrato. Para mantener la biomasa entre H3 y H9, el volumen restante del sustrato se introdujo a través de H0, es decir en el sentido contrario al flujo. Finalizado el llenado, el RA se operó durante 72 h en flujo discontinuo con recirculación interna para mantener la biomasa expandida entre H3 y H9 y para promover el contacto entre la biomasa y el sustrato. Durante este periodo se renovó cada 24 h el volumen de sustrato contenido entre H3 y H0, para evitar la acidificación excesiva del medio por acumulación de AGV y agotamiento del sustrato.

Finalizada la inoculación se procedió con la estrategia de arranque. La cual consistió en disminuir gradualmente el TRH del RA. Se inició con un TRH de 13 h y se disminuyó hasta el valor de operación previamente establecido (10 h). La disminución del TRH se realizó en función de la pseudo-estabilidad del proceso biológico, la cual fue determinada por la reducción de carbohidratos, producción de biogás, pH del efluente e incremento de AGV. Se estableció como condición de estabilidad cuando la reducción de carbohidratos fue superior al 80%. Para las tres COVe evaluadas el periodo de arranque fue inferior a 10 días.

4.1.7 OPERACIÓN, SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN

La operación, seguimiento y evaluación de cada COVe se realizó bajo condiciones similares de inoculación, arranque y operación, de esta manera se evitó la interferencia del envejecimiento de la biomasa sobre los resultados. Además, para garantizar que la COVe fuera el único factor o variable de entrada y facilitar la comparación estadística de los resultados se controló tanto la composición y características del sustrato como el pH efluente. Cada condición operacional fue evaluada en estado estacionario o pseudo-estable durante un periodo mínimo de 1,5 mes, siendo que esta ventana de observación fue suficiente para recolectar datos que permitirían estadísticamente, analizar la influencia de la COVe sobre el rendimiento de hidrógeno a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca.

4.1.7.1 Operación en flujo continuo

La operación en flujo continuo en condiciones pseudo-estables que se realizó a temperatura y presión ambiente, consistió en suministrar continuamente el sustrato, verificar las variables fisicoquímicas de entrada, registrar las variables fisicoquímicas de salida, registrar la producción de biogás y controlar continuamente la COVe en la zona de lodo (V_x). Para eso se preparaba cada 24 h un volumen aproximado de 20 L del sustrato con una concentración de carbohidratos cercana a $1,7 \text{ g CH}_2\text{O.L}^{-1}$. Luego, se registraba el pH y en caso de ser necesario, se acondicionaba el pH hasta un valor de $5,2 \pm 0,2$. Esta corrección se realizaba lentamente, primero diluyendo una cantidad de fosfato de sodio en una pequeña porción de agua destilada en un volumen inferior a 200 mL, para promover la disolución completa del reactivo se calentaba el agua destilada. Posteriormente, se adicionaba la solución de buffer de fosfato en el tanque de alimentación y se mezclaba vigorosamente, determinando el pH. El procedimiento se repetía hasta obtener el pH deseado en el sustrato. Debido a que se deseaban controlar el pH dentro del reactor, el pH afluente se ajustaba en función del pH efluente, de esta manera se evitó tanto la sobredosificación del buffer de fosfatos como, la acidificación del medio de reacción al interior del reactor.

Diariamente, se verificaban tanto el caudal de la bomba de alimentación para mantener el TRH del reactor en 10 h, como el caudal de la bomba de recirculación para mantener la biomasa expandida entre H9 y H3. También, se registraba el volumen de biogás producido en un intervalo de tiempo determinado, generalmente 24 h.

4.1.7.2 Seguimiento y evaluación del desempeño del RA

El seguimiento del desempeño del RA en flujo continuo, se realizó a través del análisis de muestras líquidas y gaseosas. Diariamente, se tomaron muestras líquidas del afluente directamente del tanque de alimentación después del acondicionamiento del pH y del efluente en el punto de muestreo denominado H0. De la fase gaseosa se extrajeron muestras del biogás almacenado en el *headspace* con una frecuencia de 2 o 3 veces por semana, la extracción se realizó conforme a lo señalado en el ítem 3.14.1.

Adicionalmente, se tomaron muestras líquidas a lo largo del reactor desde H9 hasta H0 para controlar la COVe dentro de la zona de lodo (V_x), y para monitorear el pH dentro del reactor. Estas muestras se recolectaron con una frecuencia de 1 o 2 veces por semana. Se extraían pequeñas cantidades, menores a 30 mL para evitar el desbalance del reactor. Previo a su extracción, se cerraban la entrada del afluente (válvula 3) y la salida del biogás (válvula 1), esta última para evitar presiones negativas en el reactor. La toma de estas muestras se realizaba en el menor tiempo posible, entre 5 y 10 min.

Las variables de respuesta para la evaluación del desempeño del RA fueron: eficiencia en la transformación de carbohidratos (%), eficiencia en la reducción de DQO (%), caudal de biogás ($Q_{\text{biogás}}$), producción volumétrica de biogás (PVB), composición del biogás ($\%\text{H}_2$, $\%\text{CH}_4$ y $\%\text{CO}_2$) caudal molar de hidrógeno ($Q_{\text{M}_{\text{H}_2}}$), BY y HY. También se analizó la distribución de biomasa y el pH dentro del reactor, para lo cual se construyeron diagramas de concentración de SV y pH a partir de los perfiles longitudinales del RA.

4.1.7.3 Control de la COVe

Con una frecuencia de dos veces por semana y aplicando la Ecuación 4.2 (previamente presentada en el ítem 4.1.6) se determinó la COVe real dentro del RA. En esa ecuación el producto entre V_x y X_{lodo} hace referencia al contenido total de biomasa expresada en g SV. Debido a que la biomasa en la zona de lodo presentó una concentración decreciente en sentido del flujo, el contenido total de biomasa se calculó

como la sumatoria del producto entre el volumen aferente a cada punto de muestreo entre H9 y H3, y la concentración de sólidos (SV) en cada punto, así como se presenta en la Ecuación 4.3.

$$Biomasa = V_{H9} \times X_{H9} + V_{H8} \times X_{H8} \dots \dots + V_{H3} \times X_{H3} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

En la cual,

Biomasa:	Contenido de total de biomasa en la zona de lodos (g SV)
V_{Hi} :	Volumen aferente a cada punto de muestreo (L), $i=9, 7, 6, 5, 4$ y 3
X_{Hi} :	Concentración de biomasa en cada punto de muestreo (g SV. L ⁻¹), $i=9, 7, 6, 5, 4$ y 3

En los casos que fue necesario, se efectuaron purgas de lodo para mantener la COVe dentro del reactor en el valor deseado. Las purgas fueron realizadas de las válvulas H5 y H6.

4.1.8 DISTRIBUCIÓN DE BIOMASA Y pH DENTRO DEL RA

La distribución de biomasa y pH al interior del RA se analizó a través de diagramas de contorno (X, Y, Z), los cuales fueron construidas en el software Minitab 18 donde “X” fue representada por el tiempo de evaluación, “Y” la altura del reactor y “Z” la variable de respuesta en este caso, concentración de biomasa (g SV.L⁻¹) y/o pH.

4.1.9 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.1.9.1 Composición del biogás

Las muestras de gas fueron analizadas en el Laboratorio de Saneamiento Ambiental de la Universidad Militar Nueva Granada ubicada en Bogotá, D.C. Se determinó el contenido de H₂, CH₄ y CO₂ a través de cromatografía de gases, se utilizó un cromatógrafo de gases Marca Agilent 7890A, equipado con una columna capilar Carboxen 1010 plot de longitud de 30 m y 0.32 mm de diámetro interno, argón fue el gas de arrastre. El protocolo similar al descrito por [Hernández Avilés et al. \(2016\)](#) disponía de tres rampas, las cuales elevan la temperatura del horno a 60 °C con una tasa de 5 °C.min⁻¹, seguida de un aumento a 95 °C con una tasa de 25°C.min⁻¹ y finalizaba a 230 °C con una tasa de 24 °C.min⁻¹.

4.1.9.2 Análisis fisicoquímico de la fase líquida y zona de lodos

A las muestras de la fase líquida y de la zona de lodos se determinó el pH, contenido de ST y SV. Igualmente, en las muestras de la entrada y salida del reactor se determinó la concentración de DQO, de nitrógeno amoniacal total (NAT) y de Ortofosfatos, de acuerdo con los métodos estándar ([APHA et al., 2005](#)), alcalinidad total (AT) y AB según [Jenkins et al. \(1983\)](#), AGV y alcalinidad debida a los AGV (A_{AGV}) fueron determinados adaptando el método descrito por [DiLallo y Albertson \(1961\)](#), y carbohidratos totales (CH) según el método colorimétrico ([DuBois et al., 1956](#)). Para este último, la curva de calibración (20 – 180 mg CH.L⁻¹) fue construida con una solución de sacarosa 1% (m/v) y lecturas de absorbancia a 490 nm. Todos los parámetros de la fase líquida, excepto pH y ST, fueron determinados después de centrifugar la muestra para remover biomasa suspendida.

4.1.10 CÁLCULOS

4.1.10.1 Carga orgánica volumétrica o carga orgánica aplicada (COV)

Se estimó la carga orgánica aplicada (COV) en función de unidades de DQO y CH, aplicando la Ecuación 4.4.

$$COV = \frac{C}{TRH} \times \left[\frac{24}{1000} \right]$$
Ecuación 4.4

En la cual,

COV: Carga orgánica volumétrica (g sustrato.L⁻¹ d⁻¹)

TRH: Caudal de operación (h)

C: Concentración de DQO o carbohidratos totales en el afluente (mg CH.L⁻¹)

24: Factor de conversión (h.d⁻¹)

1000: Factor de conversión (mg.g⁻¹)

4.1.10.2 Tiempo de retención hidráulico (TRH)

El TRH se calculó según la Ecuación 4.5

$$TRH = \frac{V_u}{Q_{afl}} \times \left[\frac{1000}{60} \right]$$
Ecuación 4.5

En la cual,

TRH: Tiempo de retención hidráulico (h)

V_u: Volumen útil reactor (L), previamente presentado en la Tabla 4.4 para cada RA

Q_{afl}: Caudal de entrada (mL.min⁻¹), en promedio 12,2 y 13,0 mL.min⁻¹ para RA1 y RA2 respectivamente

60: Factor de conversión (min.h⁻¹)

1000: Factor de conversión (mL.L⁻¹)

4.1.10.3 Reducción del sustrato (η)

La eficiencia de la transformación de carbohidratos (η_{CH}) y eficiencia de la reducción de DQO se calculó aplicando la Ecuación 4.6.

$$\eta_{CT \text{ o } DQO} = \frac{(C_o - C_f)}{C_o} \times 100$$
Ecuación 4.6

En la cual,

η: Eficiencia en la reducción/transformación del sustrato (%)

C_o: Concentración de DQO o CH en el afluente (mg CH.L⁻¹)

C_f: Concentración de DQO o CH en el efluente (mg CH.L⁻¹)

4.1.10.4 Caudal de biogás (Q_{biogás})

Se estimó el caudal de biogás de acuerdo con la Ecuación 4.7.

$$Q_{biogas} = \frac{V_{biogas}}{t_{lectura}}$$
Ecuación 4.7

En la cual,

Q_{biogás}: Caudal de biogás (mL.h⁻¹)

V_{biogás}: Volumen de biogás registrado por el contador volumétrico de gas (mL)

t_{lectura}: Tiempo de medición del biogás (h)

4.1.10.5 Tasa de producción volumétrica de biogás (PVB)

La PVB se estimó de acuerdo con la Ecuación 4.8.

$$PVB = \frac{Q_{biogás}}{V_u} \times \left[\frac{24}{1000} \right] \quad \text{Ecuación 4.8}$$

En la cual,

PVB: Tasa de producción volumétrica de biogás ($L_{biogás} \cdot L^{-1}_{reactor} \cdot d^{-1}$)

$Q_{biogás}$: Caudal de biogás ($mL \cdot h^{-1}$)

V_u : Volumen útil reactor (L)

24: Factor de conversión ($h \cdot d^{-1}$)

1000: Factor de conversión ($mL \cdot L^{-1}$)

4.1.10.6 Composición del biogás

La composición del biogás se determinó en función de su contenido de hidrógeno ($\%H_2$), metano ($\%CH_4$) y dióxido de carbono ($\%CO_2$) (Ecuación 4.9).

$$\%X_{gas} = \frac{nX_{gas}}{n_{total}} \quad \text{Ecuación 4.9}$$

En la cual,

nX_{gas} : Número de moles de H_2 , CH_4 o CO_2 (mol)

n_{total} : Sumatoria de $nH_2 + nCH_4 + nCO_2$ (mol)

4.1.10.7 Caudal molar de hidrógeno (QM_{H_2})

El QM_{H_2} se determinó según Ecuación 4.10.

$$QM_{H_2} = Q_{biogás} \times \frac{nH_2}{v_i} \quad \text{Ecuación 4.10}$$

En la cual,

QM_{H_2} : Caudal molar de hidrógeno ($mol \ H_2 \cdot h^{-1}$)

$Q_{biogás}$: Caudal de biogás ($mL \cdot h^{-1}$)

nH_2 : Número de moles de H_2 (mol)

v_i : volumen de gas inyectado en el cromatógrafo (mL)

4.1.10.8 Rendimiento de hidrógeno (HY) y rendimiento de biogás (BY)

El HY se determinó según Ecuación 4.11.

$$HY = \frac{QM_{H_2}}{\frac{Q_{afl}(CT_{afl} - CT_{efl})}{PM_{sacarosa}}} \times \left[\frac{10^6}{60} \right] \quad \text{Ecuación 4.11}$$

En la cual,

HY: Rendimiento de hidrógeno ($mol \ H_2 \cdot mol^{-1} \ CH$)

QM_{H_2} : Caudal molar de hidrógeno ($mol \ H_2 \cdot h^{-1}$)

Q_{afl} : Caudal afluente al reactor ($L \cdot h^{-1}$)

CH_{afl} : Concentración de carbohidratos totales en el afluente ($mg \ CH \cdot L^{-1}$)

CH_{efl}: Concentración de carbohidratos totales en el efluente (mg CH.L⁻¹)

PM_{sacarosa}: Peso molecular de la sacarosa (342 g.mol⁻¹)

10⁶: Factor de conversión

60: Factor de conversión (min.h⁻¹)

Un procedimiento similar se aplicó para calcular el rendimiento de biogás (BY).

4.1.10.9 Producción de AGV (%P)

El %P se determinó según Ecuación 4.12.

$$\%P = \frac{AGV_{efl} - AGV_{afl}}{AGV_{afl}} \times (100) \quad \text{Ecuación 4.12}$$

En la cual,

%P: Producción de AGV (%)

AGV_{afl}: Concentración de AGV en el afluente al reactor (mg A.acético.L⁻¹)

AGV_{efl}: Concentración de AGV en el efluente al reactor (mg A.acético.L⁻¹)

4.1.11 MANEJO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

De acuerdo con el objetivo específico de esta fase de la investigación y de la magnitud del montaje experimental, esta investigación se definió como un “estudio comparativo de tres poblaciones”, cada población estuvo caracterizada por el conjunto de datos de las variables fisicoquímicas que caracterizaron el desempeño del RA. De esta manera, aplicando herramientas de la estadística inferencial y con la COVe como el único factor o variable de entrada causante de las diferencias observadas, se compararon tres poblaciones para contrastar las hipótesis de investigación. La variabilidad de los resultados se analizó a través de series de tiempo y diagramas de cajas y alambres, usando las herramientas de Microsoft Excel y el software Minitab 18.

4.1.11.1 Análisis comparativo de la composición fisicoquímica del afluente en cada COVe

Para comparar estadísticamente el efecto de la COVe sobre las variables de salida fue necesario establecer estadísticamente, el aporte de la variación de la composición fisicoquímica del afluente, debido a que la comparación de los resultados se hizo en torno a tres poblaciones que se ubicaron en tres periodos diferentes dentro de tres sistemas biológicos (RA), en los que sus condiciones ambientales fueron establecidas por parámetros no controlados como la temperatura ambiente, DQO, ST, AGV y disponibilidad de nutrientes, y dos parámetros controlados (pH y CH). Por lo tanto, se realizó una comparación estadística de la composición fisicoquímica del afluente, empleando como estadístico de prueba la ANOVA de un solo factor, la cual compara las medias de tres o más muestras para determinar si difieren significativamente; esta prueba define que no es necesario que los datos estén distribuidos normalmente siempre que las muestras tengan un tamaño de por lo menos 15 o 20 datos. Se empleó un método gráfico de comparación de medias, para establecer cuál variable fisicoquímica presentó diferencias significativas, se admitieron diferencias con un nivel de significancia de 0,05.

4.1.11.2 Diseño experimental estadístico

Se empleó un diseño experimental completamente al azar con tres niveles, para probar que la variación de la COVe no influye en el rendimiento de H₂. El modelo estadístico para este diseño está dado por la Ecuación 4.13.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Para $i = 1, 2, \dots, t$ $j = 1, 2, \dots, r$ Ecuación 4.13

En la cual,

Y_{ij} : Variable de respuesta de la j-ésima réplica del i-ésimo nivel

μ : Media general (sin tener en cuenta los niveles)

τ_i : Efecto del i-ésimo nivel del factor

ε_{ij} : Efecto del error experimental asociado al i-ésimo nivel del factor y a la j-ésima réplica

El análisis de un diseño completamente aleatorizado para un solo factor consiste en un análisis de varianza, para lo cual se plantearon las siguientes hipótesis nula (H₀) y alterna (H_a):

Hipótesis nula (H₀): La variación de la COVe no influye sobre las variables de respuesta

Hipótesis alterna (H_a): La variación de la COVe influye sobre las variables de respuesta

$$H_0: \tau_i = 0 \quad H_1: \tau_i \neq 0$$

Las hipótesis fueron probadas a través de una varianza (ANOVA) unifactorial. Al rechazar la hipótesis nula y aceptar la alterna, es decir que había diferencias significativas entre los niveles evaluados, se aplicó el método de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD), para determinar cuál de los niveles era estadísticamente diferente con un nivel de significancia del 5%.

Los tres niveles del factor COVe fueron 0,8, 1,5 y 3,1 (g CH₄.g⁻¹ SV.d⁻¹) y las variables de respuesta fueron la composición del biogás, reducción de carbohidratos (%η), BY, HY, PVB, PVH y TPe.

4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1 ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES

4.2.1.1 Composición fisicoquímica del afluente

En términos generales, la composición y variación del sustrato presentada en la Figura 4.5 fue similar al agua residual que se produce en condiciones reales en rallanderías ubicadas al norte del Departamento del Cauca (Colombia) y cuyas concentraciones han sido reportadas a través de algunos estudios locales (Tablas 1.8 y 3.1) (Rojas-Chacón, 1999, Colin *et al.*, 2007, Perez *et al.*, 2009).

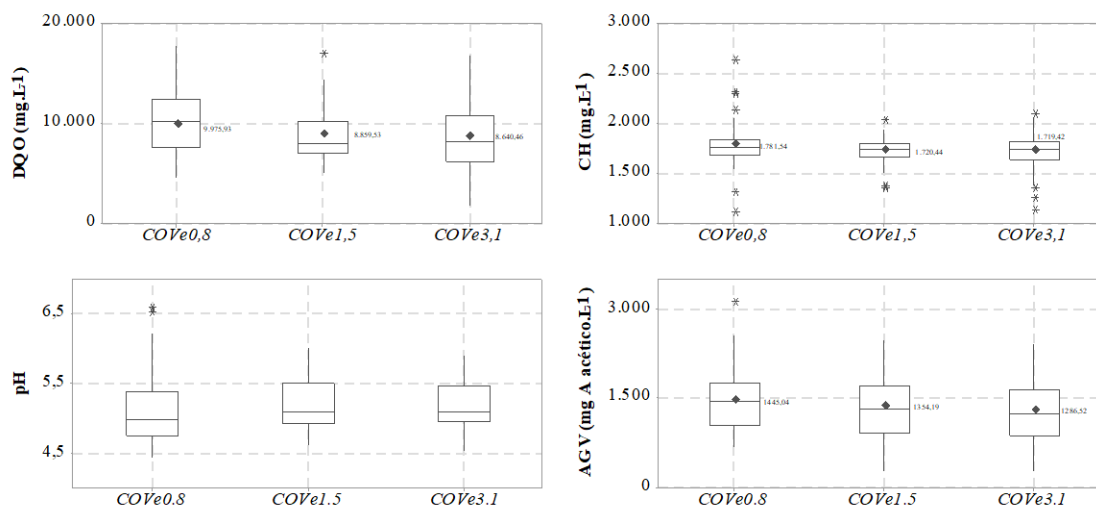


Figura 4.5 Composición fisicoquímica del afluente

Con relación a la DQO, se puede establecer que el sustrato denota una elevada concentración de materia orgánica, que para este tipo de agua residual se asocia principalmente con polisacáridos, fibras, grasas y sólidos disueltos (Cobana y Antezana, 2007, Pizarro *et al.*, 2016), todos de naturaleza biodegradable debido a se derivan de un proceso agroindustrial, donde la única materia prima son raíces de yuca (lavadas y peladas) y no hay adición de sustancias químicas inorgánicas. En contextos internacionales en los que la extracción de almidón de yuca es completamente mecanizada, se han reportado concentraciones de DQO hasta del orden de 91.300 mg.L⁻¹ en el agua residual (Amorim *et al.*, 2018).

Durante el proceso de extracción de almidón de yuca, la lechada de yuca rallada que sale de la coladora y entra a los canales de sedimentación, está compuesta principalmente por partículas de almidón, fibra fina y material proteico en suspensión (Torres *et al.*, 2014), por lo que el contenido de carbohidratos en el agua residual se relaciona con este tipo de sustancias que no fueron retenidas en los canales de sedimentación. A través de pruebas colorimétricas se descartó la presencia de gránulos de almidón en el agua residual (sustrato), por lo que el contenido de carbohidratos se deriva de los dos principales polisacáridos que lo conforman: *amilosa* y *amilopectina*, ambos son polímeros de glucosa (Pizarro *et al.*, 2016).

En el sustrato empleado en esta investigación, la concentración de carbohidratos totales (CH) obedeció a la manipulación realizada para estandarizar la disponibilidad de sustrato fermentable. Sin embargo, su valor promedio (1.750 mg CH.L⁻¹) se encuentra dentro de los límites reportados en la literatura, el cual está influenciado por la cantidad de agua utilizada y el grado de mecanización del proceso de extracción de almidón de yuca. De esta manera, los efluentes de procesos con baja tecnificación y extracción húmeda se caracterizan por su baja concentración de carbohidratos, entre 350 y 500 mg CH.L⁻¹ (Rojas-Chacón, 1999, Colin *et al.*, 2007); a medida que aumenta la mecanización del proceso también disminuye el uso de agua y por lo tanto, se incrementa la concentración de contaminantes en el agua residual, llegando hasta reportes del orden de 30.000 mg CH.L⁻¹ (Gomes *et al.*, 2016).

Por otro lado, independientemente de la cantidad de agua y tecnificación del proceso de extracción de almidón de yuca, el agua residual se caracteriza por presentar bajos valores de pH. De acuerdo con Rajasimman y Karthikeyan (2007) y Hasan *et al.* (2015) la naturaleza ácida de este tipo de agua residual es causada por la liberación de ácidos desde las raíces de yuca, y los bajos valores de pH causados por la producción de AGV, indican que el proceso de acidificación del almidón comienza en los canales de sedimentación. En este estudio, el pH del afluente se ajustó hasta un valor de $5,26 \pm 0,56$ a través de la

adición de un *buffer de fosfato* (Na_2HPO_4), la capacidad amortiguadora de esta sustancia contribuyó para neutralizar el efecto de los AGV presentes en el sustrato. Los AGV en el afluente, después de ajustar el pH presentaron un valor medio de $1.365,04 \pm 522,90 \text{ mg A.acetico.L}^{-1}$.

Los valores medios de la composición fisicoquímica de cada uno de los afluentes, en términos de DQO, CH, pH y AGV fueron comparados estadísticamente a través de análisis de varianza (ANOVA) y los resultados de este estadístico de prueba mostraron que no existieron diferencias significativas entre el valor promedio de cada muestra ($p > 0,05$). Lo anterior indica que el afluente suministrado en el estudio de cada COVe tenía la misma composición fisicoquímica, aún con las variaciones presentadas. Por lo tanto, el análisis estadístico permite eliminar el efecto de la variación de la composición del sustrato sobre las variables de respuesta, es decir, que las diferencias en el desempeño de cada uno de los RA evaluados, así como los rendimientos observados no fueron influenciados por la variación de los componentes del sustrato y pueden ser atribuidos principalmente a la variación de la COVe, debido a que este fue el principal factor diferenciador en la operación de los tres RA.

4.2.1.2 Nutrientes

Con relación a los nutrientes, el contenido de nitrógeno amoniacal total (NAT) observado en el afluente (Figura 4.6) proviene de los componentes propios de las raíces de yuca liberados durante el proceso de extracción del almidón, y su variación puede resultar de la transformación del nitrógeno orgánico a nitrógeno amoniacal. Las concentraciones medias de NAT expresadas en mg.L^{-1} fueron 99,57 (COVe0,8), 103,43 (COVe1,5) y 92,67 (COVe3,1), estos valores se encuentra dentro del rango de variación de nitrógeno total reportado por [Colin et al. \(2007\)](#) para los efluentes de 12 rallanderías ubicadas al norte del departamento del Cauca (Colombia), en su reporte los autores indican que el contenido de nitrógeno total varía entre 82 y 150 mg.L^{-1} .

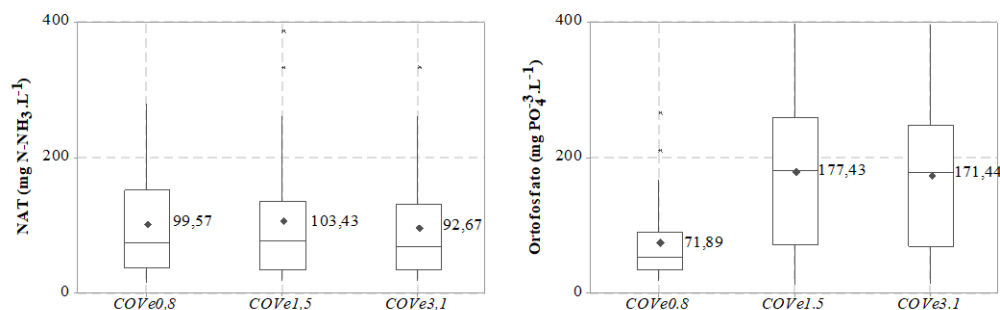


Figura 4.6 Contenido de nutrientes en el afluente de cada COVe

Con relación al contenido de fósforo, los valores típicos reportados para este tipo de agua residual varían entre 22 y 48 mg.L^{-1} expresado como fósforo total ([Colin et al., 2007](#), [Pérez et al., 2009](#)). Los valores medios de fósforo expresado en términos de mg.L^{-1} de ortofosfatos (Figura 4.6) fueron 71,89 (COVe0,8), 177,43 (COVe1,5) y 171,44 (COVe3,1), la notable diferencia de la concentración de fósforo afluente de la COVe0,8 respecto a la COVe 1,5 y 3,1 fue causada por la adición del *buffer de fosfatos*. El efecto de los nutrientes sobre el desempeño del reactor es analizado más adelante.

4.2.1.3 Temperatura ambiente

En la Figura 4.7 se presenta la variación de la temperatura ambiente. Estadísticamente no fueron observadas diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el valor promedio de cada muestra o población, es decir que las unidades experimentales en las tres COVe evaluadas estuvieron expuestas a la misma variación de la temperatura ambiente y, por lo tanto, su efecto sobre los resultados es el mismo y no pueden ser

atribuidas las diferencias observadas en las variables de respuesta a este factor ambiental no controlado. En general, la temperatura ambiente presentó un valor promedio de $28,5 \pm 1,9$ °C, ubicándose en el rango mesofílico, el cual es apropiado para la formación de los microorganismos que hacen parte de la DA entre ellos las BPH (Chernicharo, 2007).

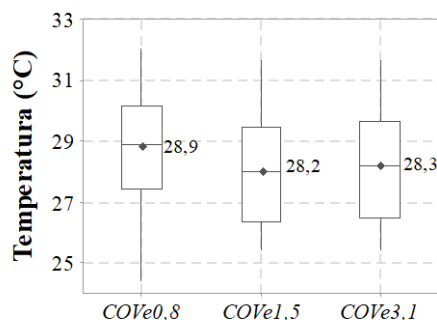


Figura 4.7 Variación de la temperatura ambiente

4.2.2 EFECTO DE LA VARIACIÓN DE LA COVe

El efecto de la variación de la COVe fue evaluado a través de la composición del biogás, rendimiento de biogás e hidrógeno, tasa de producción volumétrica de biogás e hidrógeno y tasa de producción específica de hidrógeno. En este texto la COVe es expresada en $\text{mg CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{SV} \cdot \text{d}^{-1}$.

4.2.2.1 Composición y rendimiento de biogás

Para las tres condiciones de COVe estudiadas, no fue observado metano en el biogás y solo hidrógeno y dióxido de carbono estuvieron presentes (Figura 4.8), lo cual evidencia la efectividad del pretratamiento térmico para inhibir BCH, tal como se reporta en otros estudios (Buitrón *et al.*, 2014, Park *et al.*, 2015). De igual forma, el uso de un pH relativamente bajo pudo prolongar el efecto inicial del pretratamiento del inóculo, y a través de condiciones de estrés prevenir el recrecimiento de BCH. Sin embargo, el contenido de H_2 en el biogás producido para las tres condiciones de COVe (0,8, 1,5 y 3,1) fue bajo: $\text{H}_{2\text{v/v}}$: 11,4% y $\text{CO}_{2\text{v/v}}$: 88,6%, comparado con lo observado previamente en condiciones de flujo discontinuo (hasta 30% - Capítulo 3). Thanwised *et al.* (2012) y Rosa *et al.* (2016) usando sustratos similares y reactores anaerobios de crecimiento adherido, también reportaron un bajo contenido de hidrógeno en el biogás producido, 11,65% y 4-16% respectivamente, en su estudio el bajo contenido de H_2 fue asociado con bajos tiempos de retención hidráulica (TRH), rutas metabólicas que no conllevan a la producción de hidrógeno y producción de péptidos antimicrobianos. En este estudio, el efecto del TRH sobre el contenido de H_2 fue minimizado debido a que todos los RA fueron operados bajo el mismo TRH (10 h) y de acuerdo con Gavala *et al.* (2006) y Rosa *et al.* (2014a) un TRH entre 6 y 10 h es favorable para la producción fermentativa de hidrógeno en reactores anaerobios de crecimiento suspendido. Por lo tanto, el bajo contenido de hidrógeno en el biogás puede asociarse con la ocurrencia de rutas metabólicas de tipo acidogénica que no conllevan a la producción de hidrógeno o con la inhibición de BPH a causa de bacterias ácido lácticas (BAL). La presencia de estas bacterias en efluente de procesos de producción de almidón de yuca se encuentra ampliamente documentada en la literatura (Gomes *et al.*, 2016, Rosa *et al.*, 2016).

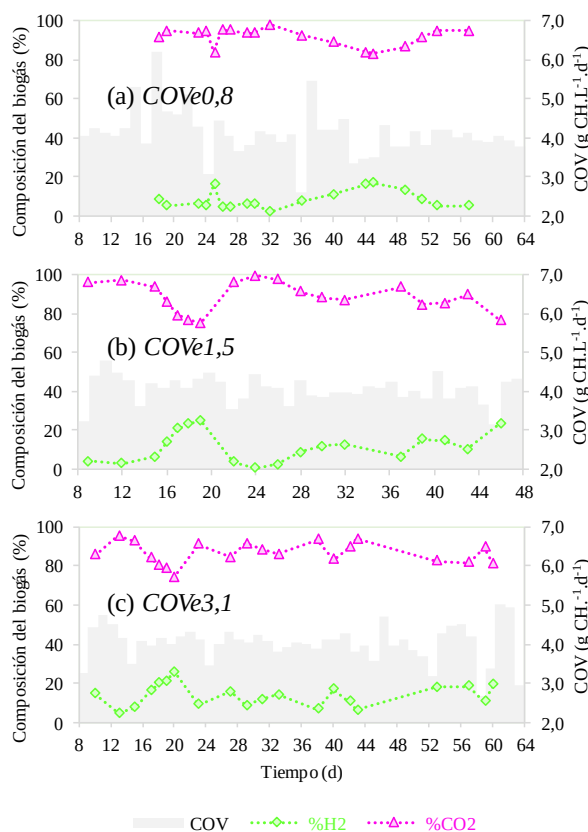


Figura 4.8 Composición del biogás

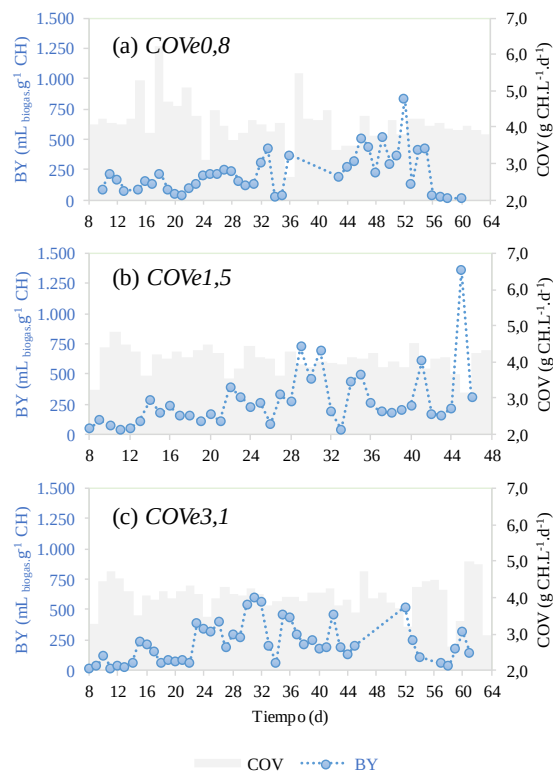


Figura 4.9 Rendimiento de biogás

Por su parte, el BY presentó un comportamiento similar en las tres condiciones de COVe. En la Figura 4.9 se observa que el BY fue inferior a $250 \text{ mL biogas.g}^{-1} \text{ CH}$ durante los primeros 20 días, después de este periodo el BY presentó una tendencia a incrementar pero con una fuerte variación, resultando en un BY promedio de $214,71 \pm 171,99$ (COVe0,8), $239,92 \pm 246,56$ (COVe1,5) y $218,99 \pm 161,49$ (COVe3,1) $\text{mL biogas.g}^{-1} \text{ CH}$. La similitud en estos resultados y su amplio rango de variación, no permitieron establecer diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ellos.

Li *et al.* (2007) sugieren que la presencia de un “buffer” promueve condiciones ambientales más estables para los microorganismos y, que su efecto se ve reflejado en una producción de biogás con menor variación o más estable. En este estudio, a pesar de la adición de un *buffer de fosfato* para el control de pH fue observada una fuerte inestabilidad en el BY, por lo que este comportamiento no concuerda con el planteamiento de Li *et al.* (2007) e insinúa la ocurrencia de otros fenómenos. De acuerdo con Calli *et al.* (2008) podrían estar asociados con cambios metabólicos durante la fermentación y consumo del biogás por actividad de bacterias acetogénicas, las cuales pueden usar el hidrógeno molecular para la reducción de dióxido de carbono a acetato (Dinamarca y Bakke, 2012) y su presencia en el inóculo puede suponerse, debido a la procedencia del mismo y al hecho de que el pretratamiento térmico no afecta a este tipo de BCH (Luo *et al.*, 2011). Thanwised *et al.* (2012) asociaron la disminución del HY con la ocurrencia de rutas metabólicas tipo fermentación para producir otros productos, como etanol y ácidos acético y butírico, que compiten con las rutas fermentativas de producción de hidrógeno.

4.2.2.2 Rendimiento de hidrógeno (HY) y reducción de carbohidratos

En la Figura 4.10 se presentan el HY y reducción de carbohidratos (% η). Con relación al HY expresado en términos de $\text{mol H}_2.\text{mol}^{-1} \text{ CH}$, se obtuvieron valores promedio de $0,26 \pm 0,24$ (COVe0,8), $0,33$

$\pm 0,30$ ($COVe1,5$) y $0,33 \pm 0,22$ ($COVe3,1$). La relación entre el HY y la COVe no pudo ser verificada, debido a que el incremento de la COVe no tuvo ningún efecto sobre el HY, la comparación estadística de estos valores soporta este resultado al mostrar que los HY no fueron diferentes significativamente ($p > 0,05$).

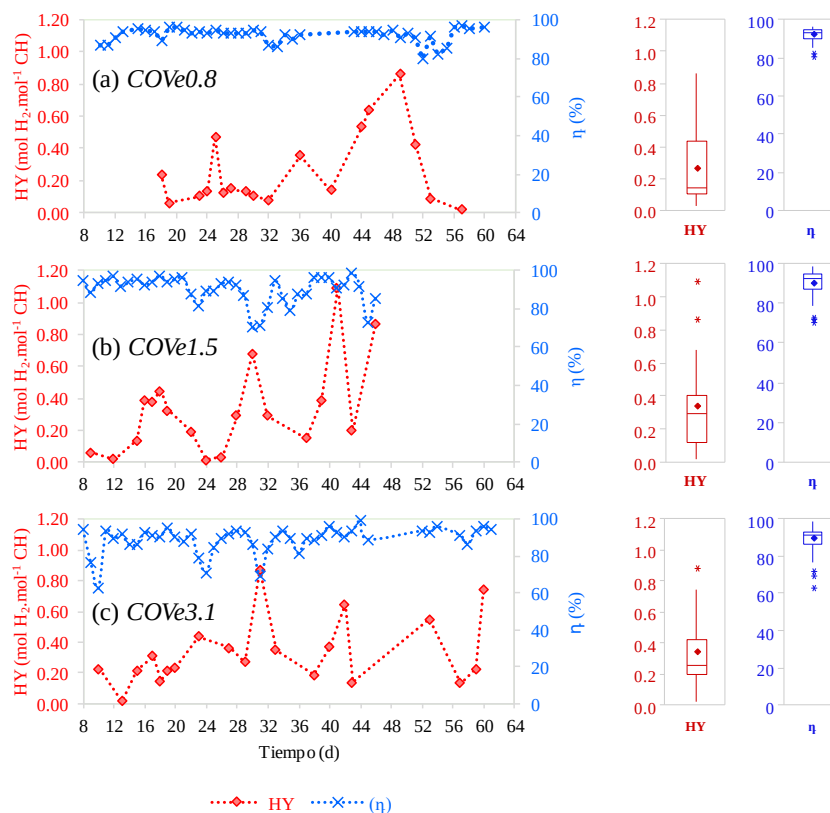


Figura 4.10 Rendimiento de hidrógeno

De acuerdo con [Park et al. \(2016\)](#) fuertes variaciones en la concentración del sustrato alteran notablemente el HY, por lo que no encontrar diferencias significativas en el HY, en este estudio, puede ser atribuido a que se mantuvo constante la concentración de CH en cada una de las COVe y durante todo el periodo de evaluación. La inestabilidad en el HY que se observa a través de las series de tiempo en la Figura 4.10, sugiere que la biomasa independientemente de su cantidad fue incapaz de mantener una condición estable de producción o rendimiento de hidrógeno. Se considera que el comportamiento observado obedece a una alternancia en la población microbiana dominante entre bacterias acidogénicas productoras de hidrógeno y bacterias acidogénicas no productoras de hidrógeno, debido a que el sustrato siguió siendo significativamente consumido. Un planeamiento similar fue expuesto por [Park et al. \(2015\)](#) quienes mostraron que la tasa de transformación del sustrato fue superior al 98% incluso cuando la proporción de *Clostridio* en un CSTR disminuyó del 24% al 9% y el HY disminuyó hasta valores inferiores a $0,1 \text{ mol H}_2.\text{mol}^{-1}$ galactosa, solo a través del análisis de la composición taxonómica utilizando secuencias del gen 16S rRNA los autores pudieron establecer que el comportamiento observado fue acompañado por el incremento de la población de *Bacilos* (bacterias acidogénicas no productoras de hidrógeno) y atribuyeron a esa especie la transformación del sustrato.

En este estudio, fueron observadas diferencias significativas en la reducción media de CH ($p < 0,05$). Entre el valor promedio de la $COVe0,8$ y $COVe1,5$ y $COVe3,1$, los valores obtenidos fueron $92,1 \pm 3,8$ ($COVe0,8$) y $89,9 \pm 7,2$ ($COVe1,5$) y $88,9 \pm 7,3\%$ ($COVe3,1$), siendo que los dos últimos no difieren estadísticamente. Este resultado es contradictorio si se tiene en cuenta que el HY es definido como la

relación entre la cantidad de hidrógeno producido y la cantidad de sustrato orgánico removido (Intanoo *et al.*, 2016) y, que previamente no se encontraron diferencias significativas entre el HY. No obstante, este comportamiento puede ser una consecuencia de la manera como se logró el incremento de la COVe, debido a que al mantener la concentración de CH en un valor constante y disminuir el contenido de biomasa para incrementar la COVe se alteró significativamente la disponibilidad de sustrato por unidad de microorganismo.

En el caso de la COVe0,8 es posible que los microorganismos estuvieran expuestos a una condición de inanición promovida por una mayor concentración de biomasa con relación al sustrato, y en consecuencia, más microorganismos actuando sobre el mismo sustrato fueron más eficientes en su transformación, mientras que para la COVe3,1 que es el extremo contrario, la disminución significativa del contacto entre el sustrato y la biomasa como consecuencia de un menor contenido de biomasa, incrementó la disponibilidad del sustrato por unidad de microorganismo, haciendo que estos fueran menos eficientes en la transformación del sustrato con el mismo TRH. Kumar *et al.* (2016) y Park *et al.* (2015) también reportaron un desacople entre la eficiencia en la reducción de carbohidratos y producción de hidrógeno usando un CSTR.

4.2.2.3 Tasa de producción volumétrica de biogás (PVB) e hidrógeno (PVH)

El hidrógeno fue detectado en el biogás desde el inicio de la operación de cada RA. Las tasas de PVB y PVH se presentan en la Figura 4.11, estas tasas relacionan el caudal de biogás o hidrógeno con el volumen de agua residual tratada.

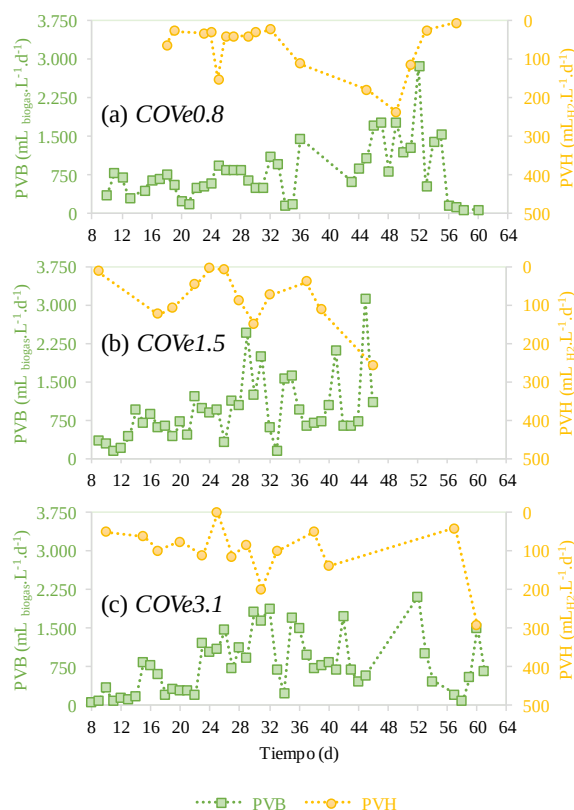


Figura 4.11 Tasa de producción volumétrica de biogás (PVB) e hidrógeno (PVH)

Aunque la PVB y PVH presentaron una tendencia a incrementarse a medida que avanzó el tiempo de evaluación, también fueron altamente variables. Específicamente, se observaron picos de alta producción seguidos por una producción casi nula. La máxima PVH fue 237, 257 y 292 mL_{H₂}·L⁻¹·d⁻¹ para COVe0,8, COVe1,5 y COVe3,1 respectivamente. Un comportamiento similar también fue descrito por [Castelló et al. \(2018\)](#) usando “lactosuero” como sustrato en un CSTR, después de obtener una PVH máxima de 800 mL_{H₂}·L⁻¹·d⁻¹ los autores reportaron que el reactor se estabilizó en una PVH muy baja, menor a 100 mL_{H₂}·L⁻¹·d⁻¹, por medio de un estudio detallado de la microbiología y ecología del reactor pudieron relacionar las fuertes variaciones e inestabilidad en la PVH con la competencia por el sustrato entre bacterias del género *Clostridium* y BAL.

Teniendo en cuenta que las BAL hacen parte de la microbiota autóctona de la yuca ([Carvalho et al., 1999](#)) y que su presencia en el agua residual del proceso de extracción del almidón de yuca ya ha sido ampliamente demostrada ([Omar et al., 2000](#), [Gomes et al., 2016](#), [Rosa et al., 2016](#)), es posible suponer que BAL provenientes del sustrato sobrevivieron y persistieron dentro del RA, dando como resultado una alternancia entre grupos de microorganismos dominantes y que su competencia por el sustrato causó la fuerte variación de la PVB y PVH. En este estudio, a través un análisis exploratorio usando la técnica de recuento de bacterias en placa superficie se verificó la presencia de lactobacilos, es decir, BAL en los RA (Figura 4.12).

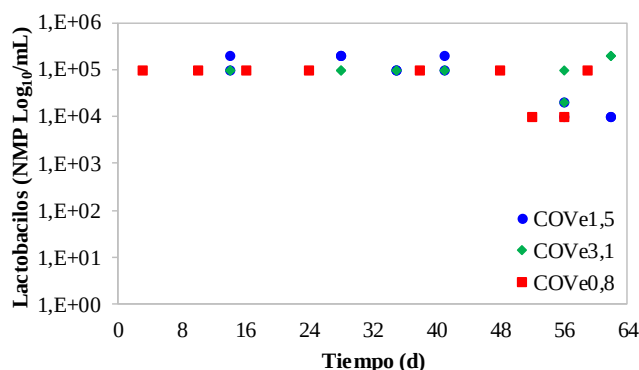


Figura 4.12 Recuento de bacterias ácido lácticas en los RA

Sin embargo, el efecto real de las BAL sobre la producción fermentativa de hidrógeno, todavía es un tema de debate. Recientemente, [Rosa et al. \(2016\)](#) mostraron que el HY y PVH máxima en un reactor anaerobio de medio fluidizado alimentado con agua residual del procesamiento de yuca, coincidió con la ausencia de BAL productoras de bacteriocinas. Por otro lado, [Gomes et al. \(2016\)](#) identificaron a la Nisina A y Nisina Z (bacteriocinas de BAL) como un factor que obstaculiza la producción de hidrógeno a partir de agua residual del proceso de producción de harina de yuca en un reactor continuo de tubos múltiples.

Previamente, [Ren et al. \(2007\)](#) habían asociado los bajos HY obtenidos en un CSTR con la acción bactericida de BAL del género *Lacococcus* sp, y su actividad bactericida fue incentivada cuando el reactor fue operado en un rango de pH entre 5,5 y 6,0. Por lo tanto, si se acepta el planteamiento anterior relacionado con la presencia de BAL en los RA de esta investigación, la variación observada en la PVH puede atribuirse también a una inhibición de las BPH debido a la acción de péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) producidos por BAL ([Gomes et al., 2015a](#)).

4.2.2.4 Tasa de producción específica de hidrógeno (TPe)

La TPe se define como la tasa de producción de hidrógeno por unidad de peso de los microorganismos del sistema o por unidad de volumen del reactor ([Intanoo et al., 2016](#)). La Figura 4.13 muestra la evolución

de la TPe a lo largo del periodo de observación para cada COVe; su comportamiento fue variable, después de obtener valores máximos se observa un decrecimiento hasta valores mínimos y luego se incrementa. La figura también muestra que los valores más bajos se presentaron con la COVe0,8 y los más altos con la COVe3,1. De esta manera, se observa que la TPe media incrementó de $11,9 \pm 11,0 \text{ mL H}_2\text{.g}^{-1} \text{ SV.h}^{-1}$ ($0,018 \pm 0,016 \text{ mmol H}_2\text{.g}^{-1} \text{ SV.h}^{-1}$) hasta $88,7 \pm 45,5 \text{ mL H}_2\text{.g}^{-1} \text{ SV.h}^{-1}$ ($0,132 \pm 0,068 \text{ mmol H}_2\text{.g}^{-1} \text{ SV.h}^{-1}$) cuando la COVe se incrementó de 0,8 hasta 3,1 g CH.g⁻¹ SV.d⁻¹. Una prueba de hipótesis mostró que existían diferencias significativas entre estos valores ($p < 0,05$), lo cual permite inferir que la variación de la COVe tuvo una influencia significativa sobre la TPe. De acuerdo con Chang y Lin (2004) la TPe denota la eficiencia de producción de hidrógeno de un reactor, por lo que se puede concluir que la COVe afectó la eficiencia de producción de hidrógeno y que el RA operado con una COVe de 3,1 g CH.g⁻¹ SV.d⁻¹ fue más eficiente con relación a la producción de hidrógeno.

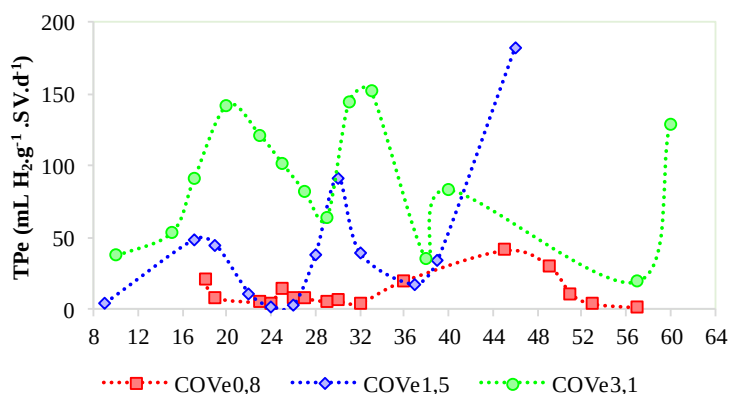


Figura 4.13 Tasa de producción específica de hidrógeno para cada COVe

En la Tabla 4.8 se presentan algunos valores de TPe observadas en estudios relacionados con la producción fermentativa de hidrógeno. La variabilidad en los reportes sugiere que aún con sustratos similares, la TPe esta no solo influenciada por la cantidad de microorganismos, otros factores relacionados con las condiciones ambientales, nutricionales y operacionales pueden influir sobre esta variable. Los resultados de este estudio son incluso mayores a los reportes de Intanoo *et al.* (2016) quienes emplearon sustratos y reactores comparables a los de esta investigación. Sin embargo, cuando se comparan bajo otros escenarios, por ejemplo de flujo discontinuo (Zhang *et al.*, 2003), los resultados de TPe son supremamente bajos.

Tabla 4.8 Tasa de producción específica (TPe)

Sustrato	Reactor	TPe (mL H ₂ .g ⁻¹ SV.d ⁻¹)	Referencia
Sintético (maicena disuelta en agua)	Batch	178	Liu y Shen (2004)
Sintético (almidón disuelto en agua)	Batch	480	Zhang <i>et al.</i> (2003)
AR del procesamiento de aceite de palma	UASB híbrido	514	Mohammadi <i>et al.</i> (2014)
AR proceso de extracción de almidón de yuca	UASB	10,92	Intanoo <i>et al.</i> (2016)

De forma preliminar, se puede concluir a partir de los datos de rendimiento recolectados, que la COVe no tuvo una incidencia clara sobre el HY, por lo que la hipótesis principal no pudo ser verificada. Sin embargo, se observaron resultados de interés relacionados con la aplicación de reactores de anaerobios de crecimiento suspendido para el control de la COVe debido a que no hubo pérdida sistemática de biomasa, superando el riesgo al que están expuestos este tipo de configuración. Así, la configuración del RA

propuesto que involucró en una sola unidad, el uso de crecimiento suspendido conformando un manto de biomasa expandida y una zona de sedimentación, puede ser explorada con COVe mayores para determinar si el bajo HY puede ser mejorado ya sea por un aumento en la concentración del sustrato o menor contenido de biomasa. Este último, resultaría en beneficio del volumen del reactor, debido a que los resultados indicaron que con una COVe alta (COVe3,1), en este caso, expresada a través de un bajo contenido de biomasa, se obtuvo un HY comparable con una COVe baja, cuatro veces menor (COVe0,8), es decir, cuatro veces más biomasa.

4.2.3 EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS EN LA FASE LÍQUIDA

La evolución de diferentes parámetros relacionados con la fase líquida se analiza a continuación.

4.2.3.1 pH y Alcalinidad bicarbonática (AB)

En la Figura 4.14 y 4.15 se presenta la variación del pH y AB respectivamente. Para la COVe1,5 y COVe3,1 (Figura 4.14 a y b) fue observado un periodo de estabilidad en el pH afluente y efluente durante los primeros 21 días de evaluación, incluso los valores en sí mismos fueron muy similares entre estas dos COVe, después se observaron alteraciones en el pH efluente con una tendencia a incrementar su valor, por lo que fue suspendida la adición del *buffer de fosfatos* para sostener el pH dentro de RA en un rango entre 5,0 y 5,4. Solo se adicionó nuevamente el *buffer de fosfatos*, cuando el pH efluente presentó valores inferiores a 5,0 y de esta manera evitar una fuerte acidificación del RA.

De otro lado, los afluentes se caracterizaron por su ausencia de AB mientras que en los efluentes se observó un incremento en la concentración de esta variable (durante algunos periodos). [Hasan et al. \(2015\)](#) y [Sentürk et al. \(2010\)](#) observaron un fenómeno similar y establecieron que el incremento de la AB en su reactor fue causada por la reacción del amoníaco, dióxido de carbono y agua para formar bicarbonato de amonio. En este estudio, la correlación lineal entre AB y NAT en el efluente fue muy baja por lo que no permitió explicar la formación de la AB tal como lo explican los autores antes mencionados. Una posible explicación a la formación de la AB puede ser encontrada en las características fisicoquímicas del inóculo, debido a que este se caracterizó por su alto contenido de AB del orden de 4.649 mg CaCO₃.L⁻¹ reportado por [Parra-Orobio et al. \(2018\)](#) quienes usaron inóculo de la misma procedencia. De esta manera, el incremento en la AB y el consecuente aumento de pH en el efluente, pueden atribuirse a una liberación de la AB contenida en la biomasa.

El planteamiento anterior puede sustentarse a través del análisis del comportamiento del pH con la COVe0,8, la cual implicó la adición de un mayor volumen de inóculo en comparación con la COVe1,5 y COVe3,1. Con esta COVe no fue necesaria la adición del *buffer de fosfatos* durante los primeros 40 días de evaluación, debido a que el pH del efluente desde el inicio presentó una tendencia a incrementarse, incluso hasta valores máximos cercanos a 7,0. En la Figura 4.14a se observa que el pH en el efluente se incrementó drásticamente entre el día 24 y 36 y en ese mismo periodo, también se incrementó notablemente la AB en el efluente (Figura 4.15a), lo que permite relacionar el incremento del pH en el efluente con la liberación de AB desde la biomasa. De manera general, en las tres condiciones de COVe el pH del efluente fue superior respecto al pH del afluente, tal como se ilustra en la Figura 4.17, y en todos los casos fue mayor a 5,0.

A través de la Figura 4.16, en la que se presenta la variación del pH en función de la altura del reactor y a lo largo del periodo de evaluación, se puede observar que al interior del RA (en sentido del flujo) el pH fue homogéneo, por lo que es posible argumentar que en ninguna de las tres COVe la biomasa estuvo expuesta a condiciones de estrés por pH (inferior a 4,5) que pudieran afectar su HY.

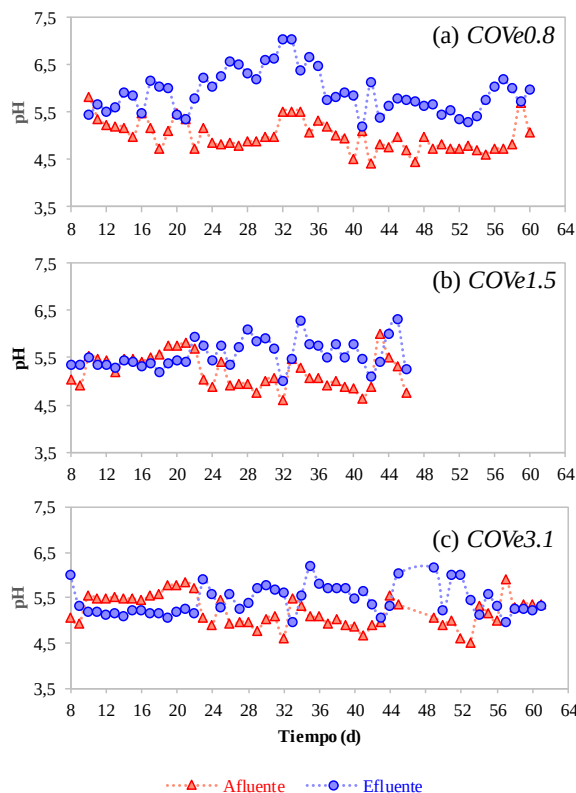


Figura 4.14 Comportamiento del pH para cada COVe

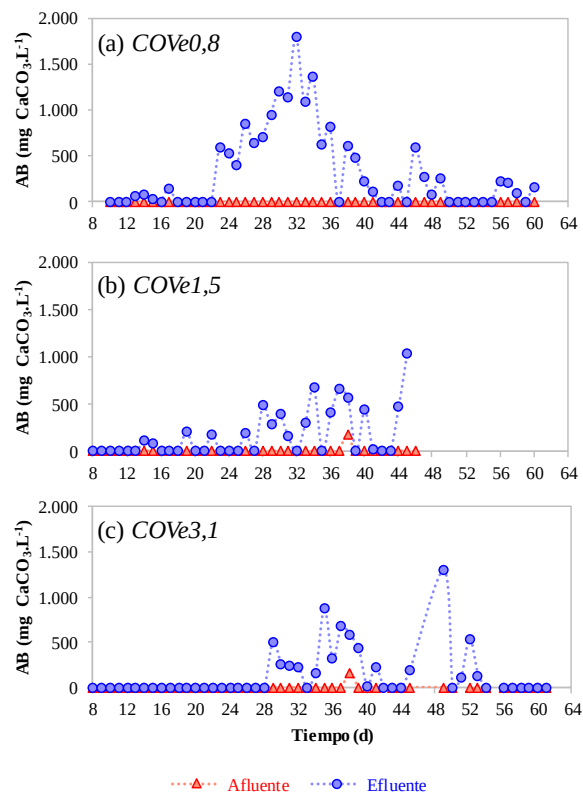


Figura 4.15 Comportamiento de la Alcalinidad bicarbonática para cada COVe

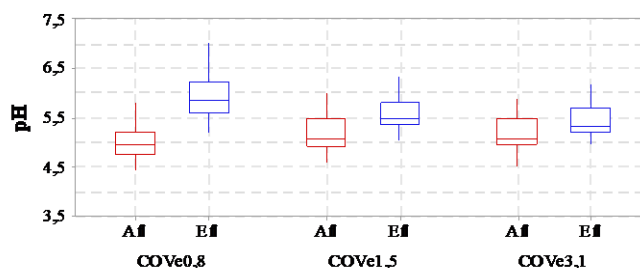


Figura 4.16 Resumen de la variación del pH según la COVe

Algunas experiencias en producción biológica de hidrógeno a través de la fermentación oscura mencionan que a pH inferior a 4,5 se afecta el HY por inhibición de la enzima hidrogenasa ([Jung et al., 2011b](#)). Así, el seguimiento del pH al interior de cada RA comprueba que los bajos HY previamente discutidos (ítem 4.2.2.2), no fueron motivados por condiciones ambientales desfavorables relacionadas con el pH que causaran la inhibición de las BPH y por tanto, toma fuerza la hipótesis de una alternancia entre los grupos microbianos dominantes de BPH y bacterias acidogénicas no productoras de hidrógeno, por ejemplo, BAL.

Por otro lado, la homogeneidad del pH al interior del RA operado con COVe1,5 y COVe 3,1 (Figuras 4.17 b y c) es consecuencia de la adición del *buffer de fosfatos* y de la misma manera, la inestabilidad diaria del pH al interior del RA evaluado con la COVe0,8 (Figura 4.17 a) es explicada por la ausencia de un *buffer*. Aunque no se estableció una correlación entre el rendimiento, ya sea de hidrógeno o biogás con el pH, la fuerte variación del pH en ausencia de un *buffer* complica el control de las condiciones ambientales, que

para el caso del RA operado con la *COVe0,8* el pH fue regulado por la alcalinidad proporcionada por el inóculo. Sin embargo, esta es una consecuencia fortuita asociada con la procedencia del inóculo.

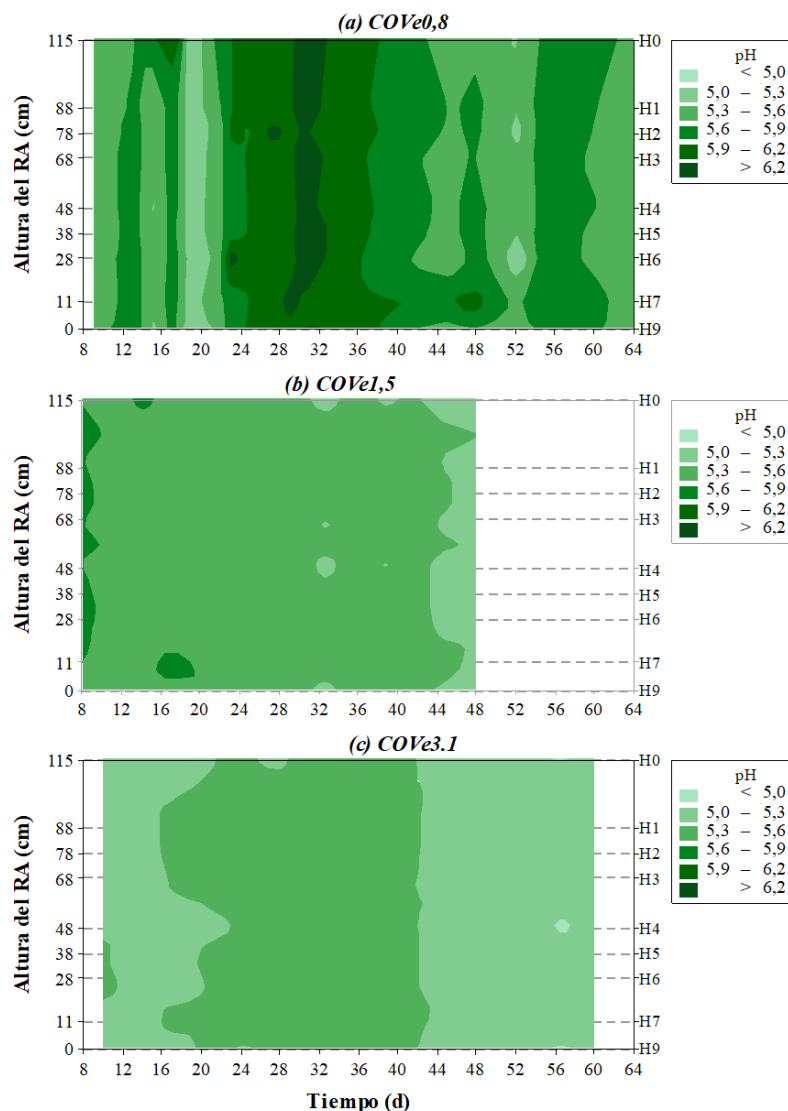


Figura 4.17 Diagrama de pH en función de la altura del RA

4.2.3.2 DQO y Ácidos grasos volátiles (AGV)

El análisis acoplado entre la DQO y AGV mostró que sus concentraciones en el afluente describían comportamientos similares. A través de correlaciones lineales (Figura 4.18) se estableció que un porcentaje significativo de la DQO presente en el afluente estaba relacionada con los AGV ($R^2 > 0,69$), este comportamiento corresponde a un resultado esperado debido a que los AGV son ácidos orgánicos de cadena corta que contienen cadenas carbonadas de menos de 6 carbonos (Chernicharo, 2007), por lo que son susceptibles de ser cuantificados como materia orgánica oxidable durante la determinación de la DQO, y su presencia en el sustrato se debe a una degradación anaerobia parcial de la materia orgánica. De acuerdo con Torres *et al.* (2005a) el contenido de AGV del agua residual generada en el proceso de extracción de almidón de yuca en las rallanderías ubicadas al norte del Departamento del Cauca (Colombia), se relaciona con la presencia de ácido láctico en altas concentraciones, y la DQO con la predominancia de materia orgánica disuelta.

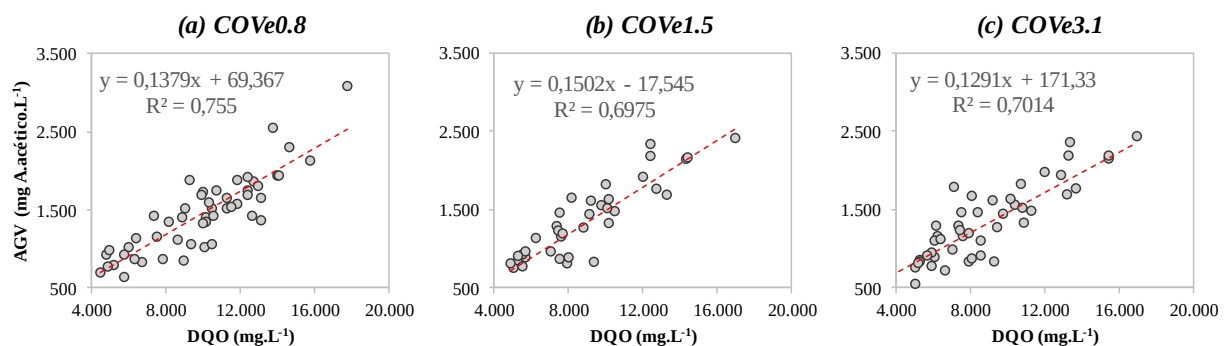


Figura 4.18 Correlación lineal entre DQO y AGV en el afluente

Las series de tiempo de la DQO y AGV (afluente y efluente) presentadas en las Figuras 4.19 y 4.20 respectivamente, muestran que estas variables presentaron concentraciones muy inestables, este comportamiento se puede atribuir a la acidificación natural que sufre el agua residual generada durante el proceso de extracción de almidón de yuca, y que no puede controlarse debido a que es causada por la microbiota autóctona de las raíces de yuca. Sin embargo, su variación no afectó el desempeño de los RA debido a que fueron observadas tanto reducciones de DQO como producción de AGV en las tres COVe, este comportamiento es característico de la etapa acidogénica (fermentación oscura) de la DA durante la cual los AGV se producen continuamente como intermediarios metabólicos (Singhania *et al.*, 2012).

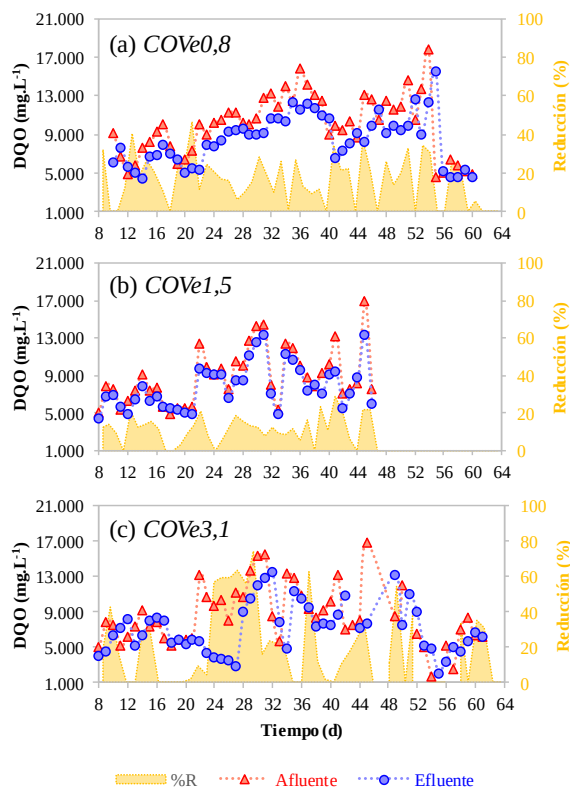


Figura 4.19 Variación y reducción de DQO para cada COVe

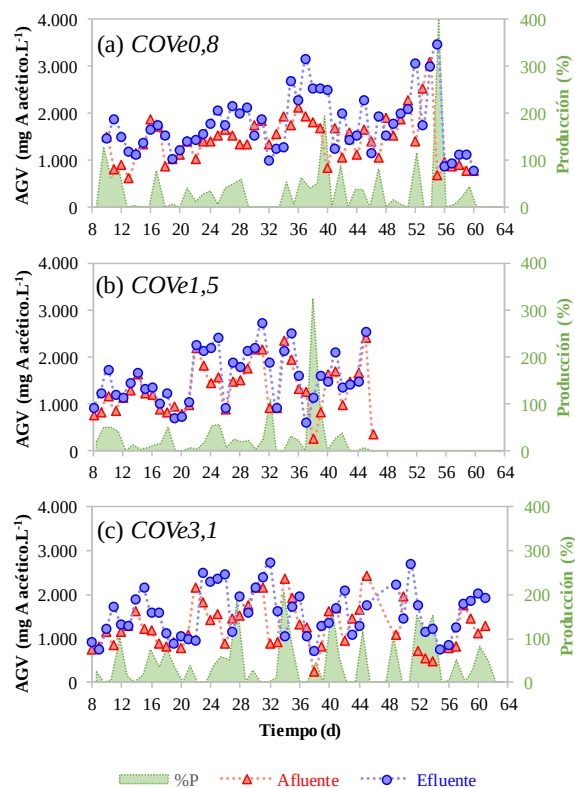


Figura 4.20 Variación y producción de Ácidos grasos volátiles para cada COVe

Con relación a la DQO se obtuvo una reducción media de $20,9 \pm 10,5\%$, $13,4 \pm 6,0\%$, $31,2 \pm 20,7\%$ para la $COVe0.8$, $COVe1.5$ y $COVe3.1$ respectivamente (Figura 4.19). Recientemente, Torres *et al.* (2017) usando un sustrato similar y reactores anaerobios de medio fijo reportaron reducciones de DQO entre 15 y

20% en un proceso de fermentación oscura. De acuerdo con [Antonopoulou et al. \(2008\)](#), [Thanwised et al. \(2012\)](#) en la fermentación oscura una fracción de la DQO inicial se transforma en DQO de los subproductos o intermediarios metabólicos, por esta razón, las bajas reducciones de DQO como las observadas en este estudio se relacionan con la producción de AGV. Aunque se presentaron producciones máximas de AGV del orden de 400,51% (COVe0,8), 324,68% (COVe1,5) y 205,75% (COVe3,1), durante el periodo de observación la producción media estuvo dominada por valores más bajos con una fuerte variación (Figura 4.20), así: $37,6 \pm 65,9$ % (COVe0,8), $29,4 \pm 54,8$ % (COVe1,5) y $43,4 \pm 55,3$ % (COVe3,1), estos valores son bajos si se comparan con los resultados de [Hernández Avilés et al. \(2016\)](#) quienes usando un reactor UASB-hibrido reportaron una producción de AGV superior al 90% a partir de un sustrato sintético. Sin embargo, en este caso, la baja producción de AGV puede ser explicada tanto por la baja concentración inicial de carbohidratos (1.750 mg.L^{-1}) como por la presencia inicial en el sustrato de AGV, los cuales de acuerdo con el pH de operación se encontraban principalmente en su forma no disociada y según lo expuesto por [Infantes et al. \(2012\)](#), [Stavropoulos et al. \(2016\)](#) su presencia supone un gasto de energía química (ATP) para mantener el pH intracelular cercano a la neutralidad y por lo tanto, reduce el HY y la producción de AGV a través de la fermentación. Este planteamiento, también permite explicar los eventos puntuales de producción máxima de AGV (Figura 4.20), los cuales ocurrieron principalmente cuando el afluente presentó concentraciones de AGV menores a $1.000 \text{ mg A.acético.L}^{-1}$, lo que podría haber disminuido los requerimientos energéticos para el mantenimiento celular y por lo tanto, dirigir el sustrato disponible hacia el crecimiento celular, producción de H_2 y AGV.

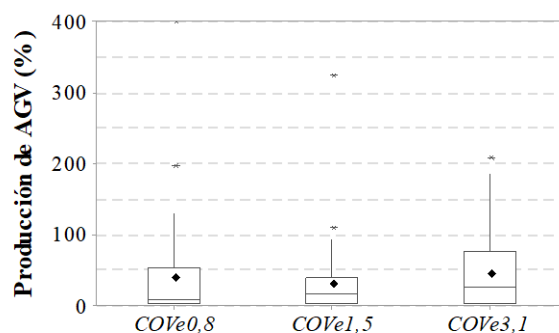


Figura 4.21 Producción de AGV por cada COVe

Las concentraciones máximas de AGV en el efluente fueron 3.486, 2.713 y 2.737 mg A.acético.L⁻¹ para la COVe 0,8, COVe1,5 y COVe3,1 respectivamente. De acuerdo con [Intanoo et al. \(2016\)](#) las BPH bajo condiciones termofílicas (37°C) toleran los AGV hasta un nivel máximo de 10.000 mg A.acético.L⁻¹, a concentraciones superiores decrece el HY debido a la toxicidad causada por la acumulación de AGV. Por lo tanto, se puede concluir que la concentración de AGV en los tres RA no afectó el HY previamente discutido, debido a que los valores máximos no superaron el umbral que causa inhibición. Por otro lado

4.2.3.3 Sólidos totales (ST) y volátiles (SV)

Las series de tiempo de los ST y SV (afluente y efluente) se presentan en las Figuras 4.22 y 4.23 respectivamente. Para todas la COVe se observa que las concentraciones efluentes (ST y SV) fueron inferiores en comparación con el afluente, lo que demuestra que en los RA ocurrió una transformación o retención de sólidos. En todos los casos la reducción media de sólidos fue superior al 42% en términos de ST y 53% para SV.

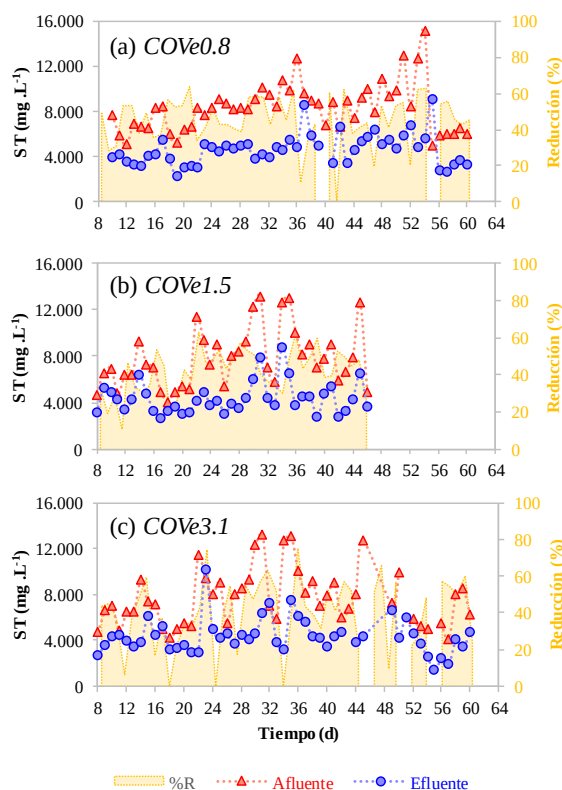


Figura 4.22 Variación y reducción de sólidos totales para cada COVe

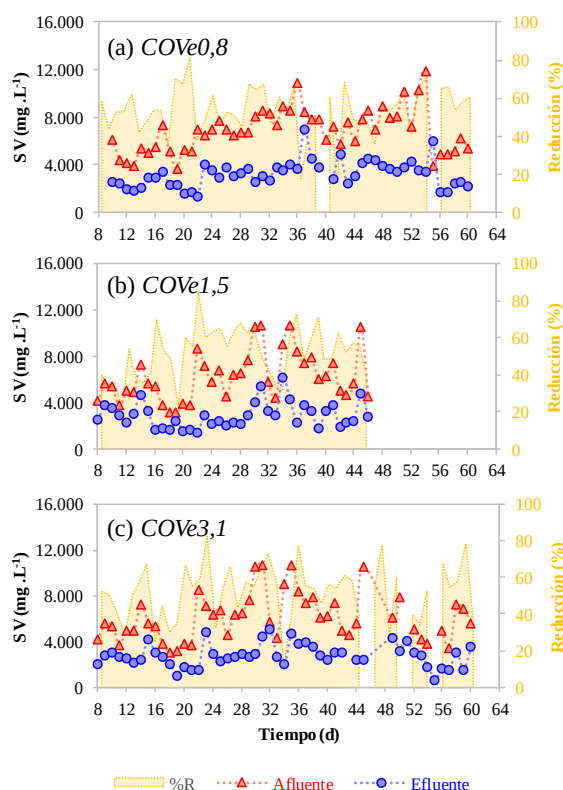


Figura 4.23 Variación y reducción de sólidos volátiles para cada COVe

La concentración media de ST afluente fue 8.281, 7.843 y 7.642 mg.L⁻¹ para la COVe0,8, COVe1,5 y COVe3,1 respectivamente, y de estos el 80% era SV que se relacionan con material orgánico (Figura 4.24). Las concentraciones de ST en el afluente fueron similares a las presentadas por Rojas-Chacón (1999) y Colin *et al.* (2007) usando el agua residual de una rallandería ubicada al norte del Departamento del Cauca (Colombia) quienes mostraron un rango de variación de ST entre 2.300 y 6.600 y que la fracción volátil representaba el 68% de los ST y de esta fracción el 30% eran sólidos disueltos volátiles (SDV) y el 38% sólidos suspendidos volátiles (SSV). También, Rajasimman y Karthikeyan (2007) reportaron concentraciones de ST similares en un agua residual de una industria de almidón de yuca, y a través de una caracterización detallada del contenido de sólidos mostraron que el 66% eran SV y de estos sólo el 15% era SSV, mientras que los sólidos disueltos totales (SDT) representaban la fracción más alta (80%) y los SST una baja proporción (17%).

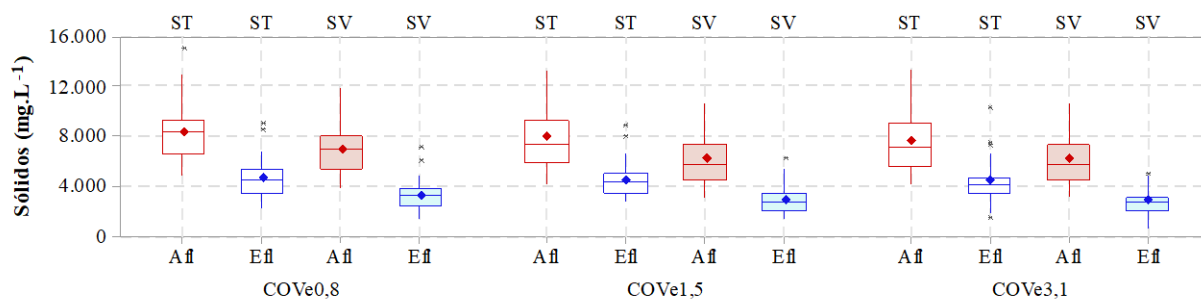


Figura 4.24 Resumen de ST y SV en el afluente y efluente

4.2.3.4 Biomasa y distribución de SV dentro del RA

En reactores anaerobios de medio suspendido de flujo ascendente, las velocidades del flujo y el ascenso del biogás tienden a arrastrar la biomasa provocando su pérdida por un efecto de lavado (Chernicharo, 2007). Para controlar este efecto, en esta investigación se incorporó la recirculación de lodo desde el punto de extracción o toma de muestra denominado H3 hasta H9 o entrada del reactor, lo cual también permitió mantener la biomasa expandida en esa sección del RA y aumentar el contacto sustrato/biomasa.

La Figura 4.25 muestra que con esta estrategia se logró mantener un alto porcentaje de la biomasa dentro de la zona de lodos (H9 a H3) y de esta manera, garantizar la COVe deseada en cada caso, durante la mayor parte del tiempo de operación

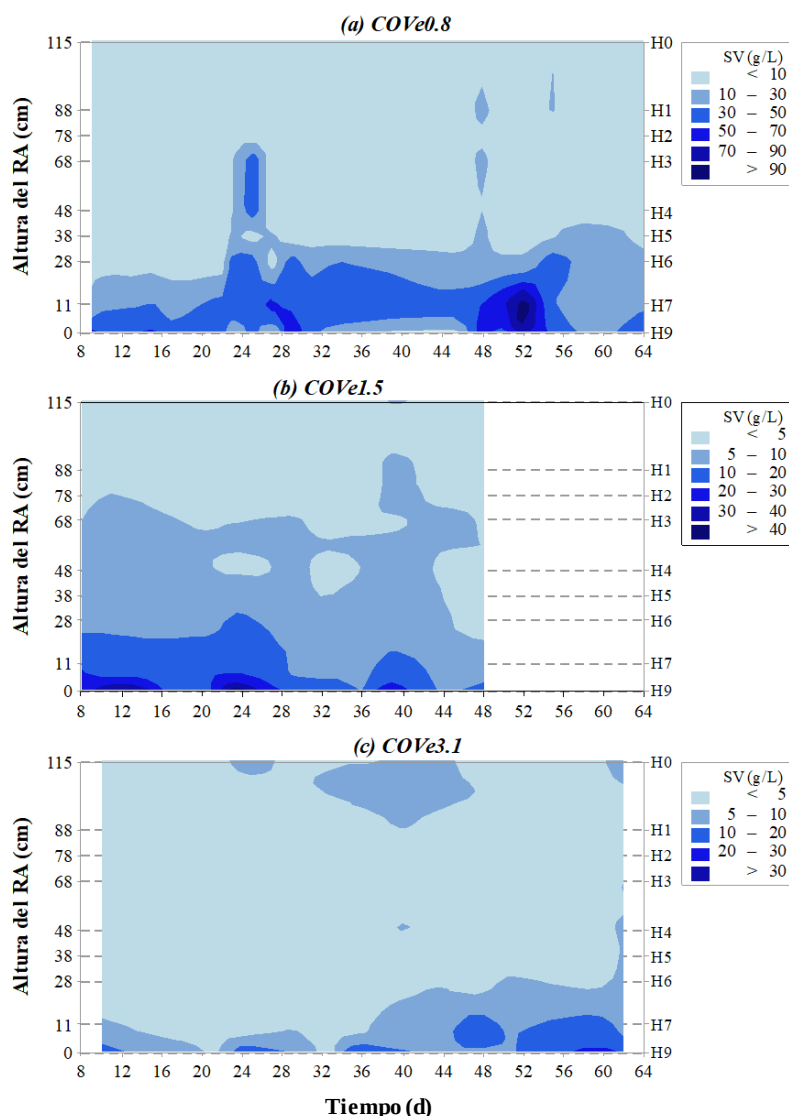


Figura 4.25 Distribución de biomasa en el RA para cada COVe

Algunos aspectos importantes fueron observados durante el control y operación de los RA. En el inicio de la operación la biomasa presentó una coloración negra oscura propia de los inóculos anaerobios metanogénicos, y durante el periodo de evaluación su coloración fue cambiando hasta presentar un color claro (blanco o cremoso) similar al del sustrato o a las raíces de yuca; un efecto similar ha sido reportado

Mu y Yu (2006), Jung *et al.* (2013). De acuerdo con Zhang *et al.* (2004), es probable que los componentes de las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) sean los responsables del cambio en la coloración de la biomasa, debido a que las proteínas son los componentes claves de las SPE para los gránulos metanogénicos, mientras que los carbohidratos, en lugar de las proteínas, podrían desempeñar un papel más importante en la formación de GPH.

Adicionalmente, se observó la formación de gránulos de apariencia densa en la zona de entrada del RA, los cuales fueron reduciendo su tamaño y densidad aparente a medida que avanzaba el flujo hasta convertirse en biomasa floculenta (Figura 4.26). La formación de gránulos y biomasa suspendida en la zona de lodos le otorgó a la configuración de los RA empleados en esta investigación, características de un reactor híbrido entre un reactor de manto de lodo granular expandido (EGSB por sus siglas en inglés) y un reactor anaerobio de crecimiento suspendido. De acuerdo con Liu *et al.* (2009), la granulación de BPH solo ocurre en condiciones experimentales favorables, por lo que es posible suponer que las variables seleccionadas para la operación de los RA, tales como pH y TRH fueron responsables de la granulación observada. Es importante anotar que las ventajas de los GPH frente a los lodos floculentos se relacionan con una estructura más densa, fácil de configurar, alta concentración de sólidos, separación de sólidos efluentes y resistencia a las cargas de choque, por lo tanto la configuración del RA implementada en esta etapa de la investigación además de facilitar el control de la COVe también representa un tipo de reactor adecuado para la fermentación oscura que ofrece las ventajas antes mencionadas.

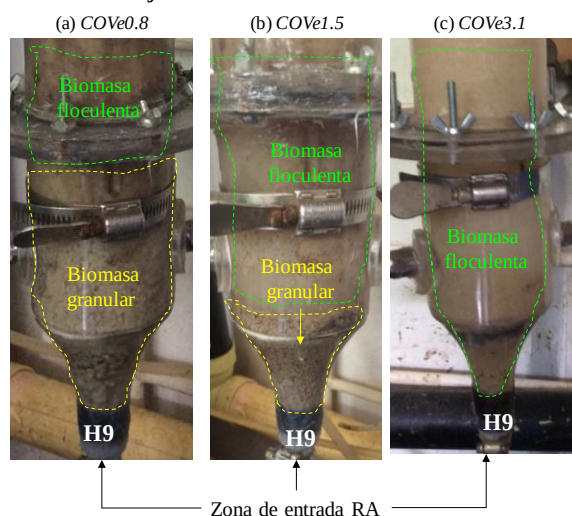


Figura 4.26 Biomasa en los RA

Las ventajas de la formación de GPH fueron documentadas a través de la operación de los RA, debido a que una granulación consistente fue observada con la COVe0,8 y COVe1,5, mientras que con la COVe3,1 los gránulos eran más escasos y la biomasa presentó una apariencia más de tipo floculenta (ver figura 4.26). Estas observaciones responden a las concentraciones de SV en la zona de lodos, las cuales fueron mayores con la COVe0,8 que con la COVe3,1. Adicionalmente, la diferencia en la granulación de la biomasa derivó en una operación más sencilla con la COVe0,8, debido a que fue más fácil lograr la expansión y control de la biomasa en la zona deseada, mientras que con la COVe3,1 la operación del RA fue más complicada, debido a que pequeñas perturbaciones en el caudal de recirculación y/o el ascenso del biogás causaban una mayor expansión de biomasa, por encima de la zona de lodo, por lo que era necesario detener la recirculación por algunos periodos (entre 1 y 4 h) para propiciar la sedimentación de la biomasa dentro de la zona de lodos y así evitar su pérdida o lavado.

Por lo anterior, la zona de lodos que actuó como un manto de lodo contribuyó con la reducción o retención tanto de ST como de SV presentes el sustrato. En la Tabla 4.9 se observa que las tres COVe

evaluadas presentaron similitud en la reducción media de ST y SV, permitiendo retener cerca del 42% de ST y 53% de SV. En la Figura 4.27 se presenta la expansión del lodo en cada una de las COVe evaluadas.

Tabla 4.9 Estadística descriptiva de la reducción de sólidos en cada COVe

Variable	COVe	n	Media	Mínimo	Máximo
Reducción de sólidos totales (%)	COVe0,8	49	45,35 ± 13,57	0,54	63,49
	COVe1,5	39	41,83 ± 12,22	10,24	63,11
	COVe3,1	47	40,43 ± 19,00	0,00	75,22
Reducción de sólidos volátiles (%)	COVe0,8	49	53,85 ± 12,69	15,06	81,15
	COVe1,5	39	51,97 ± 14,05	22,49	84,09
	COVe3,1	47	52,08 ± 15,33	12,51	82,48



Figura 4.27 Expansión del lodo en el RA para cada COVe

En la producción biológica de hidrógeno la granulación ha sido atribuida a la acción conjunta entre la liberación de biogás y la velocidad ascensional del líquido (Chang y Lin, 2004) y a la tasa de recirculación interna (Mohammadi *et al.*, 2014). En este caso, con una alta tasa de recirculación de lodos de 27, 26 y 18 veces el caudal afluente para la COVe0,8, COVe1,5 y COVe3,1 respectivamente se logró mantener una velocidad ascensional media en la zona de lodos de 1,6, 1,5 y 1,1 m.d⁻¹ para las tres COVe en el mismo orden. Las condiciones operacionales anteriores son comparables con lo reportado por Jung *et al.* (2013) quienes con una tasa de recirculación de 15 veces el caudal afluente y una velocidad ascensional de 2,65 m.

d^{-1} lograron la formación de GPH en un reactor UASB operado con un TRH de 5 h y acoplado a un sedimentador.

Aunque en esta investigación el HY fue bajo y similar en las tres COVe evaluadas, la granulación observada con la COVe0,8 puede constituirse en una ventaja al momento de seleccionar una COVe para el diseño y operación del RA debido a que la biomasa granular le otorga a los reactores acidogénicos de crecimiento suspendido y auto-inmovilizado una mayor estabilidad con relación al control de su biomasa total, y porque biomasa granular a diferencia de la biomasa floculenta tiene mayor resistencia ante la presencia de poblaciones bacterianas bactericidas (Kumar *et al.*, 2016), por ejemplo BAL, que para sustratos como el utilizado en este estudio son inevitables debido a que hacen parte de microbiota autóctona de las raíces de yuca.

4.2.3.5 Nutrientes y el efecto de la relación C/N y C/P sobre HY

En las Figuras 4.28 y 4.29 se presenta la variación del NAT y ortofosfatos respectivamente. De manera general se observa que las concentraciones de NAT en el efluente fueron superiores a las del afluente, indicando alguna producción o liberación de este compuesto durante el proceso biológico. El incremento de NAT en el efluente puede estar relacionado con la degradación de compuestos que contienen nitrógeno, como proteínas y urea, las cuales pudieron llegar al RA a través del inóculo, considerando que este provenía de un reactor UASB que trata el agua residual de un centro de sacrificio de ganado y, este tipo de agua residual se caracteriza por su alto contenido de proteínas y nitrógeno orgánico (Muñoz, 2005).

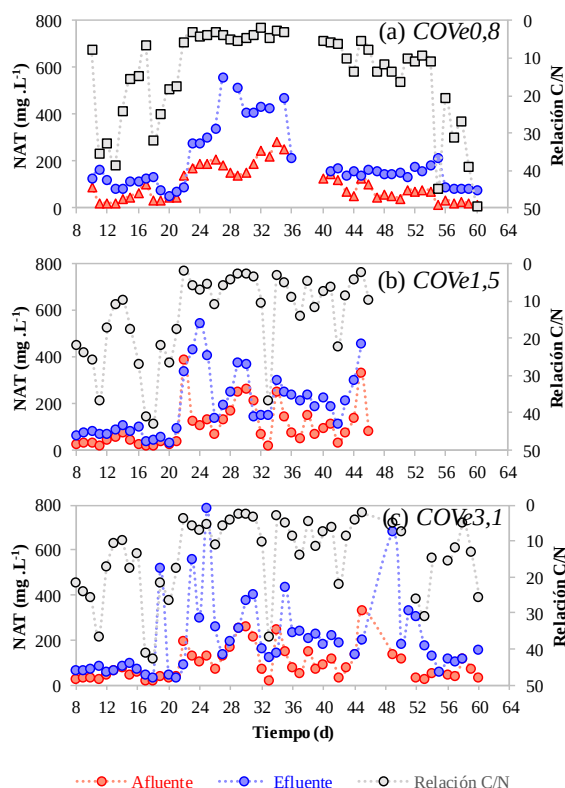


Figura 4.28 Variación del NAT según la COVe

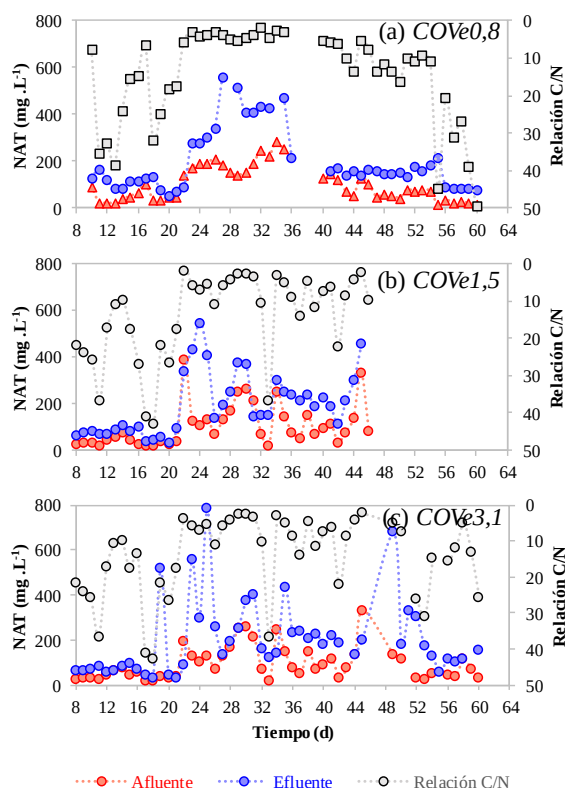


Figura 4.29 Variación de Ortofosfatos según la COVe

De acuerdo con Wang y Wan (2009), el nitrógeno desempeña una función importante en la producción fermentativa de hidrógeno porque hace parte de las proteínas, ácidos nucleicos y enzimas que

son responsables del crecimiento de las BPH. Por otro lado, altas concentraciones de nitrógeno son consideradas como inhibitorias del proceso, más aún cuando el nitrógeno está en forma de amonio libre o no disociado (NH_3) (Bundhoo y Mohee, 2016). Sin embargo, en la actualidad no hay un límite máximo que delimite los niveles inhibitorios de amoníaco en la producción biológica de hidrógeno y los umbrales se sitúan en concentraciones superiores a 800 mg.L^{-1} (Salerno *et al.*, 2006). En este estudio la concentración media de nitrógeno en el afluente fue $99,6 \pm 73,0$ (COVe0,8), $103,1 \pm 90,5$ (COVe1,5) y $92,7 \pm 74,0$ (COVe) mg NAT.L^{-1} y mientras que en el efluente fue $196,5 \pm 131,6$ (COVe0,8), $194,6 \pm 132,3$ (COVe1,5) y $201,7 \pm 166,8$ (COVe) mg NAT.L^{-1} . A pesar de la fuerte variación los valores máximos, en el efluente, no fueron superiores a 800 mg N.L^{-1} (Figura 4.28 y 4.30), por lo que se puede establecer que la concentración de NAT no fue un factor causante de inhibición para las BPH y por lo tanto, los bajos HY previamente discutidos no están influenciados por alta concentración de nitrógeno.

Por su parte, el fósforo es un nutriente inorgánico esencial para los microorganismos, y es en forma de ortofosfatos como está disponible para el metabolismo microbiano. En la producción biológica de hidrógeno además de su valor nutritivo también resalta su capacidad de amortiguación (*buffer*) (Wang y Wan, 2009). Algunas investigaciones sugieren que el aumento en la concentración de fosfatos en un rango apropiado, puede incrementar la capacidad de BPH para producir hidrógeno durante la fermentación oscura, pero concentraciones de fosfato en niveles muy elevados resulta inhibitoria y disminuye el HY (Bisaillon *et al.*, 2006), esto debido a que solo ciertas bacterias son capaces de almacenar en su masa el fósforo en exceso, frecuentemente el 30% de la masa de esas bacterias está compuesta por fosfatos, mientras que en la mayoría de bacterias incluidas las BPH solo el 2% (Chernicharo, 2007).

En este estudio, las concentraciones medias de ortofosfato en el afluente fueron $71,9 \pm 56,4$ (COVe0,8), $177,4 \pm 111,3$ (COVe1,5) y $167,9 \pm 113,3$ (COVe3,1) $\text{mg PO}_4^{3-}.\text{L}^{-1}$ (Figura 4.30). Una prueba de hipótesis mostró que existieron diferencias entre las medias en un nivel de significancia de 0,05, y una comparación gráfica definió que el valor medio de la concentración de ortofosfato en el afluente de la COVe0,8 difiere del valor medio observado con la COVe1,5 y COVe3,1 (entre estos dos no se observaron diferencias significativas). La presencia de ortofosfatos en el afluente y efluente es atribuida a la adición del *buffer de fosfatos* y su variación responde a la dosificación, la cual se realizó en función del pH efluente. Tal como se mencionó previamente, durante la mayor parte del tiempo de evaluación del RA con la COVe0,8 no se adicionó *buffer de fosfatos*, lo cual explica la diferencia observada con relación a la COVe1,5 y COVe3,1.

En la literatura son escasos los estudios que han abordado el efecto de la concentración del fósforo sobre el rendimiento de HY. Lin y Lay (2004a) a través de un estudio en flujo discontinuo con un sustrato sintético observaron un mejoramiento en la HY con una concentración de 600 mg.L^{-1} de fosfato de sodio (Na_2HPO_4); en ese estudio, un aumento o disminución del 30% en la concentración de fosfato causó una disminución de alrededor del 40% en la producción de hidrógeno. En esta investigación, la concentración media de fosfatos de los tres afluentes fue muy baja en comparación con el valor reportado por Lin y Lay (2004a), por lo que se puede suponer que esta es la razón por la cual no se observa la influencia de la concentración de fosfatos sobre el HY, aun cuando la adición del *buffer del fosfatos* incrementó en un porcentaje cercano al 60% la concentración de fosfato de la COVe1,5 o COVe3,1 respecto a la COVe0,8 (Figura 4.29 y 4.30).

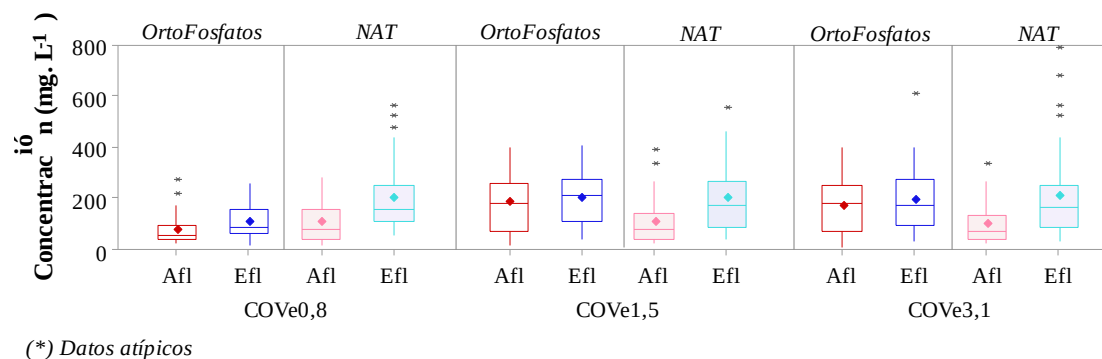


Figura 4.30 Resumen de la variación del Ortofosfatos y NAT según la COVe

La disponibilidad de Nitrógeno y Fósforo para la producción fermentativa de hidrógeno toma mayor importancia cuando se relacionan con la concentración del sustrato. Para lo cual se ha estudiado con mayor frecuencia el efecto de las relaciones C/N y C/P sobre el HY. En general, los estudios reportan el uso de relaciones C/N y C/P superiores a 25 y 125 respectivamente (Tabla 4.10). En esta investigación la relación C/N, para las tres COVe, se estableció en un rango entre 2 y 43 sin la adición de fuentes externas de nitrógeno y, la relación C/P se estableció en un rango entre 8 y 275; la variación de esta relación fue fuertemente influenciada por el *buffer de fosfatos* que se adicionó con el propósito de controlar el pH, para prevenir el efecto adverso que la acumulación de AGV tiene sobre el HY (Davila-Vazquez *et al.*, 2011).

Tabla 4.10 Relación C/N y C/P usadas en algunos procesos de fermentación oscura

Sustrato	Relación		HY	Referencia
	C/N	C/P		
Sintético	137	-	3,5 mol H ₂ .mol ⁻¹	Anzola-Rojas <i>et al.</i> (2015)
Paja de arroz	25		0,74 mmol H ₂ .g ⁻¹ sustrato	Kim <i>et al.</i> (2012a)
AR de refrescos	120	316	3,3 mol H ₂ .mol ⁻¹	Peixoto <i>et al.</i> (2011)
Almidón de trigo hidrolizado	50	125	2,84 mol H ₂ .mol ⁻¹	Oztekin <i>et al.</i> (2008)
Solución de polvo de trigo	200	1.000	281 mL H ₂ .g ⁻¹ almidón	Argun <i>et al.</i> (2008)
Sintético	47	-	4,8 mol H ₂ .mol ⁻¹	Lin y Lay (2004b)
Sintético	200	700	0,76 mol H ₂ .mol ⁻¹	Carosia <i>et al.</i> (2017)
COVe0,8	10,3 ± 9,8	79,7 ± 48,2	0,26 ± 0,24 mol H ₂ .mol ⁻¹ CH	En este estudio
COVe1,5	15,5 ± 11,9	44,1 ± 65,9	0,33 ± 0,30 mol H ₂ .mol ⁻¹ CH	
COVe3,1	18,3 ± 12,8	35,2 ± 43,0	0,33 ± 0,22 mol H ₂ .mol ⁻¹ CH	

Estadísticamente no fueron observadas diferencias significativas entre el valor medio de la relación C/N ($p > 0,05$). Mientras que los valores medios de la relación C/P sí presentaron diferencias en un nivel de significancia menor a 0,05 entre el valor medio de la relación C/P de la COVe0,8 y la COVe3,1. Bajos valores de la relación C/P indican que a una concentración fija de carbono, mayor es el contenido de fósforo. De esta manera, se puede observar que para las condiciones evaluadas, el mayor contenido de fósforo se presentó en el afluente de la COVe3,1, y el menor con la COVe0,8; esta tendencia que fue inversamente proporcional entre la COVe y la relación C/P solo fue consecuencia del requerimiento de la capacidad buffer del sistema para controlar el pH y no de los requerimientos nutricionales de los microorganismos.

4.3 CONCLUSIONES PARCIALES DEL CAPITULO 4

La similitud entre los valores medios que tomaron las variables de HY en las tres COVe conlleva a concluir que, bajo las condiciones evaluadas, la COVe no tuvo el efecto esperado, es decir, un mejoramiento en el HY. Una de las causas principales que pudo motivar este resultado es el sustrato en sí mismo, debido a que este, a diferencia de los sustratos sintéticos, contiene una carga de impurezas que pueden alterar las rutas metabólicas hacia rutas donde no hay producción de hidrógeno. Además, la presencia de BAL en los RA que fue verificada a través un análisis exploratorio de lactobacilos, pudo representar un factor incisivo que limitó la producción fermentativa de hidrógeno a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. Finalmente, un desbalance entre las relaciones C/N y C/P pudo incidir sobre el desempeño de las BPH y esto reflejarse sobre el HY. Por lo tanto, para dilucidar el verdadero efecto de la COVe sobre el HY es necesario establecer un control sobre la relación de nutrientes (N y P), así como ahondar en el efecto de las BAL sobre la producción biológica de hidrógeno, debido que en la actualidad hay hallazgos que demuestran que su presencia puede resultar benéfica en procesos de fermentación oscura.

Aunque la hipótesis principal no pudo ser demostrada, varios aspectos se han de resaltar de los resultados. En primer lugar, la configuración del RA permite dar respuesta a una necesidad relacionada con el control y la cuantificación de la biomasa, para manipular la COVe. Esto se logró a través de un reactor que involucró en su configuración aspectos de reactores completamente mezclados y crecimiento suspendido, permitiendo un desacople entre el tiempo de retención celular y el TRH. Adicionalmente, la inclusión de paredes inclinadas en la zona de salida, simulando el separador sólido-líquido del reactor UASB facilitó el retorno de biomasa, por lo que su pérdida o arrastre en la condición de baja concentración fue mínima. En segundo lugar, las condiciones hidráulicas y ambientales favorecieron la formación de gránulos productores de hidrógeno, lo cual potencia la aplicación de COVe mayores a través de la concentración del sustrato. Este resultado resulta de interés para la exploración de la producción fermentativa de hidrógeno con otros sustratos más concentrados, y en los cuales la incidencia de BAL sea menor.

De manera general, los resultados mostraron una mejor estabilidad de los RA operados con la *COVe0,8* y *COVe1,5* g CH₄.g⁻¹ SV.d⁻¹. Entre estas dos COVe el reactor operado con la *COVe0,8* por su formación consistente de GPH resultó de mayor interés para la selección de parámetros de operación del RA.

4.4 RECOMENDACIONES

Se recomienda la exploración de COVe mayores y menores que permitan ampliar la información con relación al efecto de la COVe sobre el HY. Con COVe mayores se podría explorar condiciones más críticas que permitiera que los reactores de medio suspendido como el utilizado en esta investigación, se aproximen a los rendimientos observados en reactores de crecimiento adherido. Mientras que COVe menores, permitiría incrementar la información con relación a las ventajas que la granulación de la biomasa le ofrece al proceso de producción fermentativa de hidrógeno, y con la configuración del RA empleado en esta investigación se disminuye el número de unidades experimentales, debido a que en otras investigaciones se ha requerido el uso de un sedimentador externo.

También, para futuras investigaciones se recomienda un análisis de los cambios de las poblaciones en la diversidad microbiana con diferentes valores de COVe, lo cual permitiría entender el verdadero efecto de las BAL sobre el HY.

4.5 REFERENCIAS CAPITULO 4

- AMORIM, N. C. S.; AMORIM, E. L. C.; KATO, M. T.; FLORENCIO, L. & GAVAZZA, S. (2018). The effect of methanogenesis inhibition, inoculum and substrate concentration on hydrogen and carboxylic acids production from cassava wastewater. *Biodegradation*, 29, 41-58.
- ANTONOPOULOU, G.; GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V.; ANGELOPOULOS, K. & LYBERATOS, G. (2008). Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresource technology*, 99, 110-119.
- ANZOLA-ROJAS, M. D. P.; GONCALVES DA FONSECA, S.; CANEDO DA SILVA, C.; MAIA DE OLIVEIRA, V. & ZAIAT, M. (2015). The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. *Biotechnol Rep (Amst)*, 5, 46-54.
- APHA; AWWA & WEF (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, DC: American Public Health Association.
- ARGUN, H.; KARGI, F.; KAPDAN, I. K. & OZTEKIN, R. (2008). Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1813-1819.
- BARRIOS, J. (2015). *Influencia del ph sobre la producción biológica de hidrógeno a partir de agua residual agroindustrial*. Ingeniero Sanitario y Ambiental Pregrado, Universidad del Valle.
- BISAILLON, A.; TURCOT, J. & HALLENBECK, P. C. (2006). The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 1504-1508.
- BUITRÓN, G.; KUMAR, G.; MARTINEZ-ARCE, A. & MORENO, G. (2014). Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H₂-SBR + CH₄-UASB) using tequila vinasses. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, 19249-19255.
- BUNDHOO, M. A. Z. & MOHEE, R. (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 6713-6733.
- CALLI, B.; SCHOENMAEKERS, K.; VANBROEKHOVEN, K. & DIELS, L. (2008). Dark fermentative H₂ production from xylose and lactose—effects of on-line pH control. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 522-530.
- 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, 3367-3372.
- CAROSIA, M. F.; DOS REIS, C. M.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. & SILVA, E. L. (2017). Influence of C/P and C/N ratios and microbial characterization in hydrogen and ethanol production in an anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 9600-9610.
- CARVALHO, E.; CARVALHO, H.; VILELA, E.; CANHOS, V. & ASQUIERI, E. (1999). Determinacion de la flora microbiana de la fecula de yuca fermentada (Polvilho Azedo) durante las diferentes etapas de procesamiento. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, 97-104.
- CASTELLÓ, E.; BRAGA, L.; FUENTES, L. & ETCHEBEHERE, C. (2018). Possible causes for the instability in the H₂ production from cheese whey in a CSTR. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43, 2654-2665.
- CHANG, F.-Y. & LIN, C.-Y. (2004). Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 33-39.

- CHERNICHARO, C. (2007). *Reactores anaerobios-Principios del Tratamiento Biológico de Aguas Residuales*.
- COBANA, M. & ANTEZANA, R. (2007). Proceso de extracción de almidón de yuca por vía seca. *Revista Boliviana de Química*, 24, 78-84.
- 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. *Bioresour Technol*, 98, 1602-7.
- DAVILA-VAZQUEZ, G.; DE LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; ALATRISTE-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, 3174-3181.
- DILALLO, R. & ALBERTSON, O. E. (1961). Volatile acids by direct titration. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 356-365.
- DINAMARCA, C. & BAKKE, R. (2012). Simultaneous hydrogen production and consumption in Anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Energy and Environment*, 3, 323-332.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. & SMITH, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- FIELD, J.; SIERRA-ALVAREZ, R. & LETTINGA, G. (1988). Ensayos anaerobios (Anaerobic assays). 4 Seminario de Depuración Anaerobia de Aguas Residuales. *Universidad de Valladolid, Spain*.
- GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V. & AHRING, B. K. (2006). Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 1164-1175.
- GOMES, B. C.; ROSA, P. R. F.; ETCHEBEHERE, C.; SILVA, E. L. & AMÂNCIOVARESCHE, M. B. (2015a). Role of homo-and heterofermentative lactic acid bacteria on hydrogen-producing reactors operated with cheese whey wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40, 8650-8660.
- GOMES, S. D.; FUESS, L. T.; MAÑUNGA, T.; FEITOSA DE LIMA GOMES, P. C. & 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, 8120-8131.
- GOUD, R. K.; SARKAR, O. & MOHAN, S. V. (2014). Regulation of biohydrogen production by heat-shock pretreatment facilitates selective enrichment of *Clostridium* sp. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, 7572-7586.
- HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; NAGGAR, M. H. E.; ELBESHBISHY, E. & BAGHCHEHSARAEI, B. (2010b). Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *International journal of hydrogen energy*, 35, 81-92.
- HASAN, S. D.; GIONGO, C.; FIORESE, M. L.; GOMES, S. D.; FERRARI, T. C. & SAVOLDI, T. E. (2015). Volatile fatty acids production from anaerobic treatment of cassava waste water: effect of temperature and alkalinity. *Environ Technol*, 36, 2637-46.
- HERNÁNDEZ AVILÉS, D. M.; GRISALES PENAGOS, D. K.; TATIANA, A. & CHAPARRO, R. (2016). Effect of high rate anaerobic reactor configuration on hydrogen production: packed-bed and hybrid-UASB. *Revista ION*, 29, 27-36.
- HURTADO, M. & MUÑOZ, D. (2014). *Efecto del pre-tratamiento térmico de un inóculo en la producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura de glucosa*. Ingeniero Sanitario y Ambiental Pregrado, Universidad del Valle.

- INFANTES, D.; GONZÁLEZ DEL CAMPO, A.; VILLASEÑOR, J. & FERNÁNDEZ, F. J. (2012). Kinetic model and study of the influence of pH, temperature and undissociated acids on acidogenic fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 66, 66-72.
- INTANOO, P.; CHAIMONGKOL, P. & CHAVADEJ, S. (2016). Hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactors (UASB) with an emphasis on maximum hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 6107-6114.
- JENKINS, S.; MORGAN, J. & SAWYER, C. (1983). Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 448-453.
- JUNG, K.; CHO, S.; YUN, Y.; SHIN, H. & KIM, D. (2013). Rapid formation of hydrogen-producing granules in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor coupled with high-rate recirculation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 9097-9103.
- JUNG, K.; KIM, D.; KIM, S. & SHIN, H. (2011b). Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresource technology*, 102, 8612-20.
- KIM, M.; YANG, Y.; MORIKAWA-SAKURA, M. S.; WANG, Q.; LEE, M. V.; LEE, D.-Y.; FENG, C.; ZHOU, Y. & ZHANG, Z. (2012a). Hydrogen production by anaerobic co-digestion of rice straw and sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 3142-3149.
- KUMAR, G.; SIVAGURUNATHAN, P.; PARK, J.-H.; PARK, J.-H.; PARK, H.-D.; YOON, J.-J. & KIM, S.-H. (2016). HRT dependent performance and bacterial community population of granular hydrogen-producing mixed cultures fed with galactose. *Bioresource Technology*, 206, 188-194.
- LI, J.; LI, B.; ZHU, G.; REN, N.; BO, L. & HE, J. (2007). Hydrogen production from diluted molasses by anaerobic hydrogen producing bacteria in an anaerobic baffled reactor (ABR). *Proceedings of the Water Environment Federation*, 2007, 7966-7984.
- LIN, C.-Y. & LAY, C. (2004a). Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 275-281.
- LIN, C. Y. & LAY, C. H. (2004b). Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 41-45.
- LIU, G. & SHEN, J. (2004). Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98, 251-256.
- LIU, X.-W.; SHENG, G.-P. & YU, H.-Q. (2009). Physicochemical characteristics of microbial granules. *Biotechnology advances*, 27, 1061-1070.
- LÓPEZ TORRES, M.; VILLA GÓMEZ, P. M. & ESCOBEDO, R. (2004). El comportamiento de reactores anaerobios de residuos sólidos a través de ensayos microbiológicos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 35.
- LUO, G.; KARAKASHEV, D.; XIE, L.; ZHOU, Q. & ANGELIDAKI, I. (2011). Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. *Biotechnol Bioeng*, 108, 1816-27.
- MACHADO, W. D.; MARQUETTI, F.; MOLINA, F.; GUSILS, C. & QUAIA, E. A. (2016). Caracterización de lodos como inoculantes para un reactor anaeróbico para el tratamiento de vinaza. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 93, 13-17.
- MOHAMMADI, P.; IBRAHIM, S. & MOHAMAD ANNUAR, M. S. (2014). High-rate fermentative hydrogen production from palm oil mill effluent in an up-flow anaerobic sludge blanket-fixed film reactor. *Chemical Engineering Research and Design*, 92, 1811-1817.

- MOHD, N.; RAHMAN, N.; MAN, H.; MOHD, M. & HASSAN, M. (2011). Microbial characterization of hydrogen-producing bacteria in fermented food waste at different pH values. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 9571-9580.
- MU, Y. & YU, H.-Q. (2006). Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. I: Physicochemical characteristics of hydrogen-producing granules. *Biotechnology and Bioengineering*, 94, 980-987.
- MUÑOZ, D. M. (2005). Sistema de tratamiento de aguas residuales de matadero: para una población menor 2000 habitantes. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 3, 87-98.
- NAKHLA, G.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A.; REID, G. & BAGHCHEHSARAEI, B. (2008). The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4064-4073.
- OMAR, N. B.; AMPE, F.; RAIMBAULT, M.; GUYOT, J. P. & TAILLIEZ, P. (2000). Molecular diversity of lactic acid bacteria from cassava sour starch (Colombia). *Syst Appl Microbiol*, 23, 285-91.
- OZTEKIN, R.; KAPDAN, I. K.; KARGI, F. & ARGUN, H. (2008). Optimization of media composition for hydrogen gas production from hydrolyzed wheat starch by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4083-4090.
- PARK, J.-H.; KUMAR, G.; PARK, J.-H.; PARK, H.-D. & KIM, S.-H. (2015). Changes in performance and bacterial communities in response to various process disturbances in a high-rate biohydrogen reactor fed with galactose. *Bioresource Technology*, 188, 109-116.
- PARK, J.-H.; LEE, S.-H.; JU, H.-J.; KIM, S.-H.; YOON, J.-J. & PARK, H.-D. (2016). Failure of biohydrogen production by low levels of substrate and lactic acid accumulation. *Renewable Energy*, 86, 889-894.
- PARRA-OROBIO, B. A.; DONOSO-BRAVO, A.; RUIZ-SÁNCHEZ, J. C.; VALENCIA-MOLINA, K. J. & TORRES-LOZADA, P. (2018). Effect of inoculum on the anaerobic digestion of food waste accounting for the concentration of trace elements. *Waste Management*, 71, 342-349.
- PEIXOTO, G.; SAAVEDRA, N.; VARESCHE, M. & ZAIAT, M. (2011). Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 8953-8966.
- PEREZ, A.; TORRES, P. & SILVA, J. (2009). Anaerobic treatment of cassava starch extraction wastewater. Optimization of environmental and operational variables. *DYNA*, 76, 139-148.
- 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, 139-148.
- PIZARRO, M.; SANCHEZ, T.; CEBALLOS, H.; MORANTE, N. & DUFOUR, D. (2016). Diversificación de los Almidones de Yuca y sus Posibles Usos en la Industria Alimentaria. *Revista Politécnica*, 37, 1.
- RAJASIMMAN, M. & KARTHIKEYAN, C. (2007). Aerobic digestion of starch wastewater in a fluidized bed bioreactor with low density biomass support. *Journal of Hazardous Materials*, 143, 82-86.
- REN, N.; XING, D.; RITTMANN, B. E.; ZHAO, L.; XIE, T. & ZHAO, X. (2007). Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environmental Microbiology*, 9, 1112-1125.
- ROJAS-CHACÓN, O. (1999). *Evaluación del comportamiento de tres sistemas de tratamiento anaerobia para la depuración de las aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca*. Maestria, Universidad del Valle.

- 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.
- ROSA, P. R. F.; SANTOS, S. C.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. & SILVA, E. L. (2014a). 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. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, 13118-13127.
- SALERNO, M. B.; PARK, W.; ZUO, Y. & LOGAN, B. E. (2006). Inhibition of biohydrogen production by ammonia. *Water research*, 40, 1167-1172.
- SENTÜRK, E.; INCE, M. & ENGIN, G. O. (2010). Treatment efficiency and VFA composition of a thermophilic anaerobic contact reactor treating food industry wastewater. *Journal of hazardous materials*, 176, 843-848.
- SINGHANIA, R.; PATEL, A.; CHRISTOPHE, G.; FONTANILLE, P. & LARROCHE, C. (2012). Biological upgrading of volatile fatty acids, key intermediates for the valorization of biowaste through dark anaerobic fermentation. *Bioresource Technology*.
- STAVROPOULOS, K. P.; KOPSAHELIS, A.; ZAFIRI, C. & KORNAROS, M. (2016). Effect of pH on Continuous Biohydrogen Production from End-of-Life Dairy Products (EoL-DPs) via Dark Fermentation. *Waste and Biomass Valorization*, 7, 753-764.
- THANWISED, P.; WIROJANAGUD, W. & REUNGSANG, A. (2012). Effect of hydraulic retention time on hydrogen production and chemical oxygen demand removal from tapioca wastewater using anaerobic mixed cultures in anaerobic baffled reactor (ABR). *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 15503-15510.
- TORRES, D. G. B.; LUCAS, S. D. M.; ANDREANI, C. L.; CARVALHO, K. Q. D.; 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, 160-172.
- TORRES, P.; CAJIGAS, A. & PÉREZ, A. (2005a). Importancia del pH y la alcalinidad en el tratamiento anaerobio de las aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca. *Ciencias*.
- TORRES, P. & PÉREZ, A. (2010). Specific methanogenic activity: a tool for control and optimization of anaerobic wastewater treatment system (in Spanish: 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.
- TORRES, P.; VALENCIA, Y. & CANCHALA, T. (2014). Modelación de la separación de partículas no retenidas en la etapa de sedimentación en canales: proceso de extracción de almidón de yuca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12, 81-89.
- WANG, J. & WAN, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International journal of hydrogen energy*, 34, 799-811.
- ZHANG, J.-J.; LI, X.-Y.; OH, S.-E. & LOGAN, B. E. (2004). Physical and hydrodynamic properties of flocs produced during biological hydrogen production. *Biotechnology and Bioengineering*, 88, 854-860.
- ZHANG, T.; LIU, H. & FANG, H. H. (2003). Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *J Environ Manage*, 69, 149-56.

Capítulo 5 Acople entre dos reactores anaerobios para la producción conjunta de H_2 y CH_4 con énfasis en el periodo de arranque del reactor metanogénico

La producción fermentativa de hidrógeno genera un efluente con una mezcla de AGV que ejercen un contenido importante de DQO que requiere de una estabilización. La coproducción de hidrógeno y metano ha sido reportada usando sustratos sintéticos (glucosa) y reales (ej. agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, agua residual del procesamiento de café, vinazas de tequila, vinazas de la caña de azúcar, etc). Por lo tanto, el acople de estos dos procesos resulta factible. Sin embargo, dada la variabilidad de las características de los efluentes acidogénicos es necesario analizar el efecto de esa variación sobre el desempeño de los RM.

Es bien conocido que el proceso de arranque de un RM condiciona su desempeño a largo plazo. Y ante un efluente acidogénico (sustrato) que presenta una gran variabilidad, se requieren determinar los límites de tolerancia, tanto a las condiciones operacionales como a la composición del sustrato, para garantizar un adecuado funcionamiento del RM. La revisión de literatura permitió identificar que el reactor anaerobio de crecimiento adherido y de flujo mixto, es una tecnología que se adapta a las características del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, generada en las rallanderías ubicadas al norte del Departamento del Cauca (Colombia). En procesos de DA en una fase, las condiciones de operación más apropiadas para ese reactor giran en torno a una COV variable entre 6,0 y 12 g DQO.L⁻¹.d⁻¹ y TRH entre 12 y 20 h. Además, que el alcalinizante más apropiado para dotar de capacidad *buffer* al sistema es el bicarbonato de sodio. Por las características presentadas del efluente acidogénico, es probable el RM a estudiar sea sometido a COV mayores, así que las condiciones de operación y los requerimientos ambientales pueden diferir de los establecido previamente.

Por lo anterior, el objetivo de este capítulo fue investigar el acople entre un RA y un RM para la producción conjunta de hidrógeno y metano, simulando un proceso de DA en dos fases, con énfasis en el periodo de arranque del RM. Para tal fin, el documento está dividido en Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Recomendaciones y Bibliografía. En los materiales y métodos se detalla el arranque y operación de los dos reactores, la forma de recolección y el procesamiento de los datos, así como el análisis estadístico. Los resultados y análisis se abordan primero analizando el desempeño del RA a través del HY y después se discute el arranque del RM. Se utilizan series de tiempo, box-plot, tablas y figuras para presentar los resultados. Finalmente, se presentan las conclusiones y se sugieren algunas recomendaciones para estudios futuros.

5.1 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.1 SUSTRATO

Se utilizó como único sustrato y fuente de carbono agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, denominado en el Capítulo 3 con la sigla S2. La preparación del sustrato fue idéntica al proceso descrito en el Capítulo 4. Previo a la alimentación del RA se estandarizó la concentración de carbohidratos en el sustrato hasta un valor cercano a 1.750 mg CH.L⁻¹. Las principales características fisicoquímicas del sustrato se presentan en la Tabla 5.1, las cuales fueron semejantes al sustrato empleado en el Capítulo 4 y al agua residual derivada de las rallanderías ubicadas al norte del Departamento del Cauca (Colombia) (Colin *et al.*, 2007).

Tabla 5.1 Características fisicoquímicas el sustrato

Parámetro fisicoquímico	Unidades	Promedio	Máximo	Mínimo	Número de datos	Métodos analíticos
pH	-		7,5	4,2	175	APHA <i>et al.</i> (2005)
Nitrógeno Amoniacal Total (NAT)	mg N-NH ₃ .L ⁻¹	169 ± 393	2.226	1	170	
Orto-Fosfato	mg PO ₄ ⁻³ .L ⁻¹	309 ± 20	964	29	172	
ST	mg.L ⁻¹	7.575 ± 2.712	14.775	1.750	175	
DQO (total)	mg.L ⁻¹	7.313 ± 2.885	16.256	2.267	171	
Alcalinidad Total (AT)	mg CaCO ₃ .L ⁻¹	435 ± 359	2.629	22	162	
Alcalinidad Bicarbonática (AB)		38 ± 205	1.708	0	163	Adaptando el método descrito por DiLallo y Albertson (1961)
Ácidos grasos volátiles totales (AGV)	mg A.acético.L ⁻¹	1.421 ± 521	3.360	416	178	
Carbohidratos Totales	mg CH.L ⁻¹	1.727 ± 375	4.285	1.042	169	DuBois <i>et al.</i> (1956)
Relación DQO:N:P	-	350:0,1:0,9	-	-	166	

5.1.2 INÓCULO Y ACLIMATACIÓN

El inóculo corresponde al mismo lodo anaerobio mixto utilizado en los experimentos descritos en los Capítulos 3 y 4. En este caso se recolectaron dos muestras del inóculo para someter a cada una, a una estrategia diferente de aclimatación con el propósito de obtener dos inóculos aclimatados, uno para inocular el RA y otro para el RM, los inóculos fueron denominados: *inóculo-RA* e *inóculo-RM*.

5.1.2.1 Aclimatación y pretratamiento del inóculo-RA

El inóculo-RA fue aclimatado y pretratado térmicamente a 85°C durante 30 min, siguiendo los mismos procedimientos previamente descritos en el Capítulo 4. Las características del inóculo-RA aclimatado y pretratado se presentan en la Tabla 5.2, en la cual se observa que el pretratamiento térmico fue un método efectivo para inhibir inicialmente la actividad de BCH debido a que el inóculo pretratado no presentó AME.

Tabla 5.2 Características fisicoquímicas del inóculo-RA aclimatado y pretratado

Parámetro fisicoquímico	Unidades	Inóculo-RA		Métodos analíticos
		Aclimatado	Pretratado	
pH	-	6,57	6,30	APHA <i>et al.</i> (2005)
ST	g.L ⁻¹	76,4	74,5	
SV	g.L ⁻¹	55,0	61,2	
AME	g DQO-CH ₄ .g ⁻¹ SV ⁻¹ .d ⁻¹	0,231	0	Field <i>et al.</i> (1988), (Torres y Pérez, 2010)

5.1.2.2 Aclimatación del inóculo-RM

El inóculo-RM fue sometido a una etapa de aclimatación progresiva para obtener un inóculo enriquecido con microorganismos capaces de reconocer y usar como fuente de carbono y energía la materia orgánica presente en el efluente del RA. La aclimatación se realizó a temperatura y presión ambiente. En un recipiente cerrado se dispuso una mezcla de Lodo:Sustrato con una proporción volumétrica de 60:40 (5,0 L lodo: 3,3 L sustrato), dos veces por día se agitó la mezcla para incentivar el contacto sustrato: biomasa. Diariamente, durante 5 días, se reemplazó el sobrenadante por una mezcla de sustratos conformada por el efluente fresco del RA y agua residual del centro de sacrificio de ganado (fuente del inóculo). Inicialmente, la mezcla de sustratos presentó una mayor proporción de agua residual del centro de sacrificio de ganado y se fue disminuyendo en proporciones del 20% hasta alcanzar en la mezcla el 100% del efluente del RA. Previo a la sustitución del sustrato, se determinaba la DQO del sobrenadante para establecer el grado de asimilación del sustrato, aceptándose reducciones de DQO mayores a 60% como un buen indicativo del proceso de aclimatación y reconocimiento del sustrato por parte de los microorganismos. En la Tabla 5.3 se presenta la reducción de DQO obtenida durante la aclimatación. En ella se observa la rápida asimilación del sustrato por parte de los microorganismos, como resultado de las altas reducciones de DQO presentadas desde el inicio de la aclimatación (> 70%), y su tendencia a aumentar a medida que se incrementaba la proporción del sustrato S2 en la mezcla.

Tabla 5.3 Aclimatación del inóculo-RM

Día	Relación entre AR del centro de sacrificio de ganado y S2 (%)	DQO (mg.L ⁻¹)		Reducción de DQO (%)
		inicial	final	
1	80/20	17.183	5.046	71
3	60/40	17.933	3.192	82
4	40/60	12.267	2.108	83
5	20/80	12.683	1.921	85
6	0/100	14.600	1.581	89

Finalizado este periodo, se retiró el sobrenadante y el inóculo-RM aclimatado mostró las características presentadas en la Tabla 5.4. Se resalta el valor de la AME alcanzado (0,26 g DQO-CH₄.g⁻¹ SV·d⁻¹), lo cual indica que el lodo estaba dotado de características apropiadas para llevar a cabo un proceso de DA. Autores como [Field et al. \(1988\)](#), [López Torres et al. \(2004\)](#) y [Machado et al. \(2016\)](#) indican que lodos anaerobios con AME entre 0,02 a 0,20 g DQO-CH₄.g⁻¹ SV·d⁻¹ denotan una buena actividad metanogénica y son apropiados para uso como inóculos en reactores anaerobios. Por otro lado, la relación de SV/ST (0,81) fue aceptada como un buen indicativo del contenido de biomasa activa que suponía la potencialidad del lodo para obtener un buen arranque del RM.

Tabla 5.4 Características fisicoquímicas del inóculo-RM aclimatado

Parámetro fisicoquímico	Unidades	Valor	Métodos analíticos
pH	-	7,23	APHA et al. (2005)
Sólidos totales	g.L ⁻¹	77,7	
Sólidos volátiles	g.L ⁻¹	57,2	
Relación SV/ST	-	0,81	-
Actividad Metanogénica Específica (AME)	g DQO-CH ₄ .g ⁻¹ SV ⁻¹ .d ⁻¹	0,26	Field et al. (1988) , Torres y Pérez (2010)

5.1.3 UNIDAD EXPERIMENTAL

La unidad experimental estuvo conformada por dos reactores dispuestos en serie simulando un proceso de DA en dos fases o fases separadas, los reactores fueron denominados RA (reactor acidogénico) y RM (reactor metanogénico).

5.1.3.1 Reactor Acidogénico - RA

El RA correspondió con la misma unidad experimental denominada RA1 descrita en el Capítulo 4. Este reactor de flujo ascendente, tiene una zona de entrada, zona de lodo, zona de sedimentación, zona de salida y zona de acumulación de biogás. Para mantener la biomasa expandida, el reactor contaba con una recirculación interna desde la zona de lodo hacia la zona de entrada. Por su configuración y funcionamiento hidráulico se clasifica el reactor como de manto expandido y crecimiento suspendido. El volumen útil de este reactor es de 7,31 L y una altura total de 1.26 m. Otras características de este reactor ya fueron detalladas en el Capítulo 4.

5.1.3.2 Reactor Metanogénico - RM

El RM fue un reactor anaerobio de crecimiento adherido de flujo mixto (ascendente y descendente). Se adoptó esta configuración porque ya había sido evaluada con éxito para el tratamiento en una sola fase, del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca por [Rojas \(1999\)](#), [Torres et al. \(2003\)](#), [Colin et al. \(2007\)](#) y [Pérez et al. \(2009\)](#). Las investigaciones previas, las cuales incluyen estudios a escala de laboratorio y escala real, demostraron que ese tipo de reactor era el que mejor se adaptaba a las características del agua residual y que mejor respondía ante la discontinuidad en el proceso productivo, esta última característica fue fundamental para la selección de esa tecnología para el tratamiento de los efluentes de las rallanderías ubicadas al norte del departamento del Cauca (Colombia).

El RM fue construido en acrílico (espesor 4mm) con dimensiones de 54 cm de largo, 12 cm de ancho y 20 cm de alto, para un volumen total de 13,3 L; estaba conformado por una cámara de entrada, cámara de reacción y cámara de salida. La alimentación del reactor se realizó en la cámara de entrada, sumergida hasta 2 cm del fondo del reactor. La cámara de reacción se dividió con tres tabiques transversales, conformando cuatro compartimientos ubicados con una altura de paso de 1/5 de la altura total para forzar el flujo mixto (ascendente y descendente). En la cámara de salida se instaló un canal transversal para controlar el nivel de agua en el reactor, de tal forma que se garantizara la sumergencia del medio de soporte y la recolección homogénea del efluente. En el fondo de la cámara de salida se instaló un tabique inclinado para provocar la sedimentación de sólidos o biomasa que hubiesen sido arrastrados por el flujo. Una cubierta hermética fue instalada sobre la parte superficial del RM. El biogás captado fue conducido hacia una trampa de agua y un contador volumétrico. En la Figura 5.1 se presenta el RM.

En la cámara de reacción se instaló el medio de soporte o adherencia. Como medio de adherencia de biomasa se utilizaron anillos en policloruro de vinilo corrugado, con dimensiones de 2 cm de diámetro y largo de 3 cm aproximadamente, este material presentó un índice de espacios vacíos de 92% y ocupó el 70% del volumen de la cámara de reacción. El nivel de agua en la zona de reacción se mantuvo a 3 cm por encima del medio de soporte. En la Figura 5.2 se ilustra el medio de adherencia.

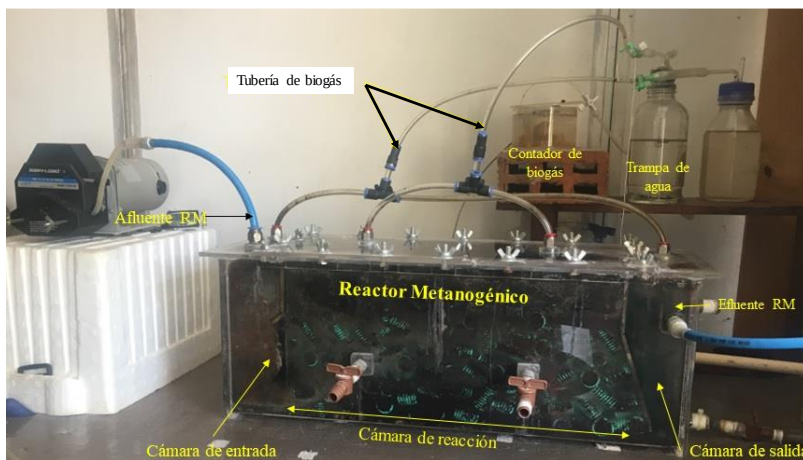


Figura 5.1 Reactor Metanogénico



Figura 5.2 Medio de soporte: anillos en policloruro de vinilo corrugado

En la cámara de reacción se instalaron flautas verticales desde el fondo hasta la superficie para favorecer la liberación del biogás, así como para prevenir represamientos que pudieran afectar el funcionamiento hidráulico del reactor. En la Figura 5.3 se ilustra la distribución de las flautas verticales, la cuales fueron construidas con tubería de diámetro $\frac{1}{4}$ " con perforaciones de 4mm de diámetro.

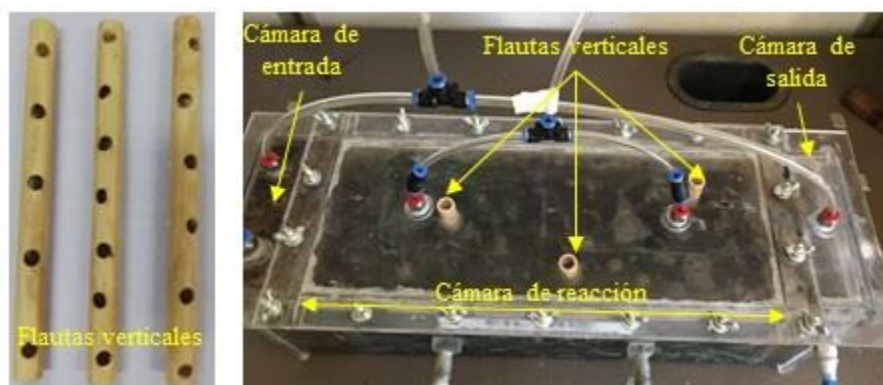


Figura 5.3 Distribución de flautas verticales en RM

Un esquema de la disposición de los dos reactores (RA y RM) se presenta en la Figura 5.4.

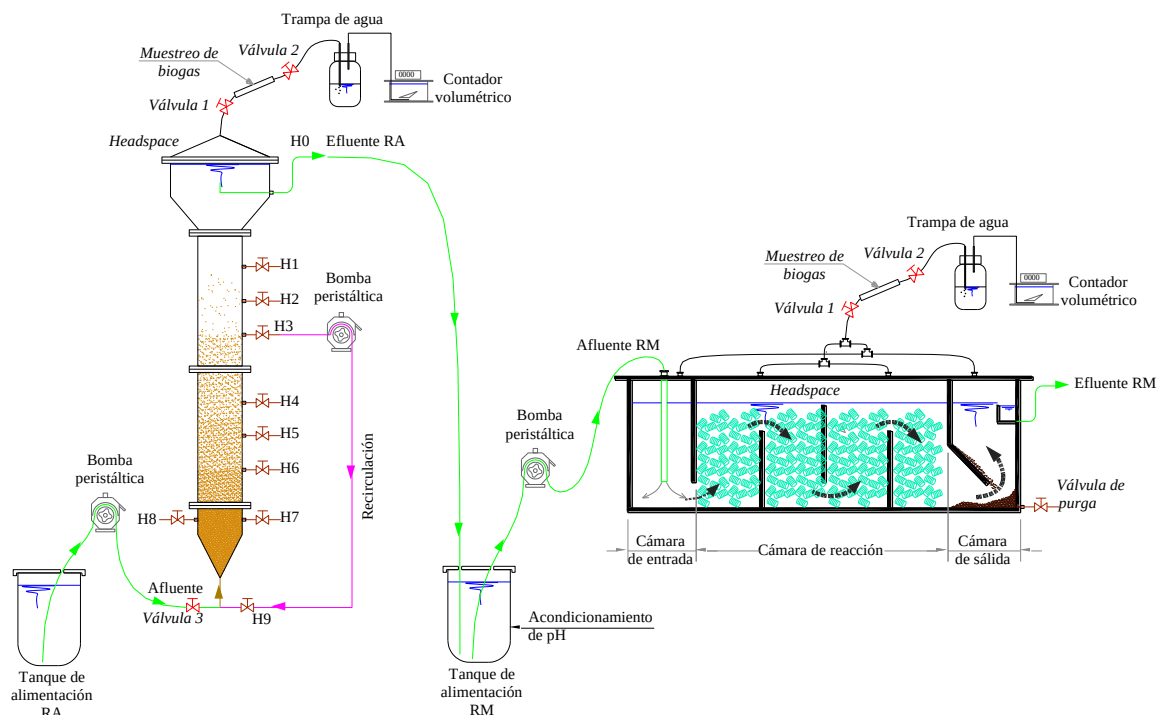


Figura 5.4 Esquema de la unidad experimental - RA y RM

5.1.4 SEGUIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS

Para realizar el conteo de biogás, el *headspace* de cada uno de los reactores se conectó, a través de una manguera de silicona, a una trampa de agua que permitió presurizar cada reactor y a través del burbujeo, comprobar cualitativamente la producción de biogás. Luego, se instaló un contador volumétrico para registrar cuantitativamente el biogás producido. Se utilizaron los mismos contadores de biogás, descritos en el Capítulo 4. El contador identificado como C2 se instaló en el RA y C1 en el RM y. Las dimensiones y otras características de estos contadores están registradas en la Figura 4.5 y Tabla 4.5 del Capítulo 4. El registro de biogás se realizó en intervalos de 24 h aproximadamente, acompañados del registro de temperatura ambiente. Una vez registrado el volumen de biogás se reiniciaban los contadores de biogás. La extracción de biogás se realizó conforme a lo presentado en el Capítulo 3, ítem 3.15.

5.1.5 DESCRIPCIÓN DEL ARREGLO EXPERIMENTAL

5.1.5.1 Evaluación del acople entre un RA y RM para la producción de H_2 y CH_4

En el Capítulo 4 se observó que una COVe aplicada al RA de $0,8 \text{ g CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{ SV} \cdot \text{d}^{-1}$ permitió un buen control del contenido de biomasa y además, fomentó la formación de GPH, por lo que para este estudio se seleccionó esa COVe para la operación del reactor. De igual forma que en la etapa anterior, se estableció una concentración constante de carbohidratos totales en el afluente de $1.750 \text{ mg CH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$ y un pH de $5,2 \pm 0,2$. Con relación al TRH, se escogió un valor de 8 h, el cual fue menor al aplicado en los RA del estudio anterior y reportado en el Capítulo 4, con el propósito de aumentar la velocidad del flujo y proporcionar mejores condiciones hidráulicas que propiciaran la granulación de la biomasa y liberación de biogás, y de esta forma incentivar el aumento del HY.

Con relación al RM, debido a que se no se conocían las condiciones óptimas de operación como fase metanogénica, se utilizó la etapa de arranque para determinar las mejores condiciones de operación de

este reactor. Para establecer la condición inicial se tomaron en consideración los resultados presentados por Pérez *et al.* (2006) y Colin *et al.* (2007) quienes sugieren una COV óptima de operación entre 6,0 y 12 kg DQO.m⁻³.d⁻¹. para la DA en una fase del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca.

5.1.6 INOCULACIÓN Y ARRANQUE

5.1.6.1 Reactor Acidogénico

La inoculación del RA fue similar a la utilizada en los reactores RA de la etapa anterior descrita en el ítem 4.16 del Capítulo 4, en este caso se introdujeron 0,47 L del inóculo-RA aclimatado con concentración de sólidos volátiles de 61 g SV.L⁻¹, y se completó el volumen útil del reactor con el sustrato, al cual previamente se le habían ajustado los carbohidratos en 1,75 g CH.L⁻¹ y el pH a 5,2, este último mediante la adición de fosfato de sodio (Na₂HPO₄) disuelto en agua destilada. Finalizado el llenado, el RA se operó durante 72 h (3 d) en flujo discontinuo con recirculación interna para mantener la biomasa expandida entre H3 y H9 y para promover el contacto entre la biomasa y el sustrato. Durante este periodo se renovó cada 24 h el volumen de sustrato contenido entre H3 y H0, para evitar la acidificación excesiva del medio por acumulación de AGV y agotamiento del sustrato. Posteriormente, el RA fue operado en flujo continuo, iniciando con un TRH de 13 h el cual fue disminuido gradualmente hasta el TRH de 8 h previamente establecido. La disminución del TRH se realizó en función de la pseudo-estabilidad del proceso biológico, la cual fue determinada por la reducción de carbohidratos, producción de biogás, pH del efluente e incremento de AGV. En este caso el periodo de arranque fue de 28 d, durante el cual se disminuyó el TRH en proporciones cercanas al 5% respecto al TRH anterior para evitar la pérdida de biomasa por efecto de lavado.

5.1.6.2 Inoculación y estrategia de arranque del reactor metanogénico

La inoculación del RM se realizó cuando el RA ya había sido operado durante 40 d y se encontraba en condiciones pseudoestables (reducción significativa de carbohidratos y producción de biogás), y consistió en introducir un volumen de inóculo-RM aclimatado equivalente al 20% del volumen útil del reactor y completar el volumen restante con efluente fresco del RA. Previamente, al pH del efluente del RA que presentó un valor de 5,0 se le ajustó hasta un valor de 7,6 para evitar la acidificación del RM durante el arranque. Luego, el RM fue operado en flujo discontinuo con recirculación durante 24 h con el propósito de facilitar el contacto entre el sustrato y la biomasa y fomentar el crecimiento de la biopelícula sobre el medio de adherencia. Posteriormente, el RM fue alimentado en flujo continuo durante 24 h para renovar el sustrato y evitar la acidificación, finalizado este periodo se operó nuevamente en modo discontinuo con recirculación durante 24 h. La alternancia entre flujo discontinuo y continuo se realizó durante 5 d. Finalmente, se dio inicio al arranque del RM con un TRH de 48 h.

La estrategia de arranque del RM consistió en disminuir gradualmente el TRH desde 48 hasta 12 h. Ensayos preliminares permitieron establecer que 48 h era un TRH adecuado para iniciar el arranque del RM, debido a que con TRH más bajos no se obtuvo una respuesta favorable en cuanto a la formación de biopelícula ni producción de biogás. Se seleccionó 12 h como el menor TRH debido a que estudios previos desarrollados dentro del grupo de investigación, habían mostrado que el rango de operación se encontraba entre 10 a 20 h para el tratamiento anaerobio en una fase del agua residual del proceso de extracción del almidón de yuca (Pérez *et al.*, 2006, Perez *et al.*, 2009). La disminución del TRH se realizó función de la respuesta del reactor frente a la reducción de carga aplicada, en términos de DQO y SST. Se aceptaron mínimo cuatro días consecutivos con reducciones de carga superiores a 40% como una respuesta positiva de la capacidad del reactor para transformar la carga aplicada. También, el comportamiento de otras variables (AGV, pH, alcalinidad, índices de alcalinidad, producción de biogás y rendimiento de metano) fue tenido en cuenta para la reducción del TRH. Para interpretar los índices de alcalinidad (IB, α y AI/AP) se

tomaron como referencia los rangos presentados en la Tabla 5.5, recomendados por [Jenkins *et al.* \(1983\)](#), [Ripley *et al.* \(1986\)](#), [Rojas \(1999\)](#) y [Pérez y Torres \(2008\)](#) para determinar condiciones de inestabilidad o estabilidad en reactores anaerobios.

Tabla 5.5 Valores de los índices de alcalinidad recomendados para determinar estabilidad en reactores anaerobios

Índice	Valor recomendado
Buffer (IB)	0,20 a 0,35
AI/AP	0,40 a 0,55
Alfa (α)	> 0,65

Durante toda la evaluación, el acondicionamiento del pH del efluente del RA se realizó a través de la adición de bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Esta sustancia fue seleccionada con base en las recomendaciones de [Torres *et al.* \(2005a\)](#), [Perez *et al.* \(2009\)](#) quienes establecieron entre varios alcalinizantes que el bicarbonato de sodio es el producto más apropiado para el acondicionamiento de la alcalinidad del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, porque garantiza la capacidad buffer necesaria durante el proceso anaerobio.

5.1.7 OPERACIÓN, SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN

La operación, seguimiento y evaluación del desempeño del RA tuvo una duración de 180 d. Durante este periodo se controló el contenido de SV dentro de la zona de reacción para mantener una COVe de $0,8 \text{ g CH}_3\text{g}^{-1} \text{ SV.d}^{-1}$. De igual forma, se controló el caudal de entrada al RA para garantizar un TRH promedio de $8,0 \pm 0,5 \text{ h}$. La rutina de operación diaria fue similar a la descrita en el ítem 3.1.7.1, la cual consistió en suministrar continuamente el sustrato con una concentración de carbohidratos cercana a $1,7 \text{ g CH}_3\text{L}^{-1}$, verificar el pH efluente y en caso de ser necesario, ajustar el pH del sustrato para mantener un pH al interior del RA en valor cercano a $5,2 \pm 0,2$.

La operación, seguimiento y evaluación del arranque del RM tuvo una duración de 140 d. Para la alimentación del reactor, se recolectaba durante 24 h el efluente acidogénico, luego se homogenizaba y se tomaba un volumen para satisfacer el consumo del RM durante 24 de acuerdo con el TRH. A este volumen se le acondicionaba el pH a través de la adición de bicarbonato de sodio. Luego, el sustrato se mantenía bajo refrigeración (15°C) para evitar la descomposición del material orgánico en el balde de alimentación. Desde ahí, a través de una bomba peristáltica se introducía el sustrato en la cámara de entrada del RM. Es importante establecer, que en la cámara de entrada al RM el afluente presentó una temperatura entre 23 y 25°C , ligeramente inferior a la temperatura ambiente que tuvo una variación de $28 \pm 4^\circ\text{C}$.

Para evaluar el desempeño de los dos reactores, se recolectaron muestras de la fase líquida, en el afluente y el efluente, y muestras de la fase gaseosa, la extracción del gas se realizó conforme a lo señalado en el ítem 3.14.1. Adicionalmente, en el RA se extrajeron muestras líquidas a lo largo del reactor desde H9 hasta H0, para monitorear tanto el pH como el contenido de SV. Cuando fue necesario se realizaron purgas o extracción de lodo para controlar la COVe.

Las variables de respuesta para la evaluación del desempeño del RA fueron: eficiencia en la transformación de carbohidratos (%), PVB, composición del biogás ($\%\text{H}_2$, $\%\text{CH}_4$ y $\%\text{CO}_2$) y HY. También, se analizó la distribución de biomasa y el pH dentro del reactor, para lo cual se construyeron diagramas de concentración de SV y pH a partir de los perfiles longitudinales del RA.

Las variables de respuesta para evaluar el proceso de arranque del RM fueron reducción de carga de DQO y SST. Los niveles mínimos aceptados para cambiar la condición de operación (TRH) fueron del 40%. A medida que avanzaba el proceso de arranque se fue incrementado el nivel mínimo de eficiencia, hasta obtener una eficiencia cercana al 70% en la reducción de carga de DQO y SST. Adicionalmente, se incluyó el rendimiento de metano (MY).

5.1.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.1.8.1 Composición del biogás

Las muestras de gas fueron analizadas en el Laboratorio de Procesos Biológicos de la Escuela de Ingeniería de Sao Carlos, Universidad de Sao Paulo (Brasil). La composición del biogás fue analizada a través de cromatografía de gases (Shimadzu GC-2010) utilizando una columna Supelco Carboxen Plot 1010 (longitud: 30 m, diámetro interno: 0,53 mm) con argón como gas de arrastre (Rosa *et al.*, 2014b).

5.1.8.2 Análisis físicoquímico del sobrenadante

A las muestras líquidas del afluente y efluente de cada reactor se les determinó la concentración de DQO, ST, SV, SST, NAT y Ortofosfatos, de acuerdo con los métodos estándar (APHA *et al.*, 2005), AB y total AT según Jenkins *et al.* (1983), ácidos grasos volátiles totales (AGV) y alcalinidad debida a los AGV (A_{AGV}) adaptando el método descrito por DiLallo y Albertson (1961). Para las muestras del RA, se determinó el contenido CH según el método colorimétrico (DuBois *et al.*, 1956). Todos los parámetros de la fase líquida, excepto pH y ST, fueron determinados después de centrifugar la muestra para remover biomasa suspendida.

5.1.9 CÁLCULOS

Las ecuaciones de cálculo para determinar la COV, TRH, reducción del sustrato (η), composición del biogás y HY relacionados con el RA fueron iguales a las presentadas en el ítem 4.1.10.1.

5.1.9.1 Rendimiento de metano (MY)

El MY se determinó según Ecuación 5.1.

$$MY = \frac{Q_{BG} \cdot \%CH_4}{Q_{afl} \cdot (C_o - C_f)} \quad \text{Ecuación 5.1}$$

En la cual,

MY: Rendimiento de metano (mL CH₄. g⁻¹ DQO)

%CH₄: Contenido de CH₄ en el biogás (%)

Q_{biogás}: Caudal de biogás (mL.d⁻¹)

Q_{afl}: Caudal de entrada del RM (L.h⁻¹)

C_o: Concentración de DQO en el afluente (g.L⁻¹)

C_f: Concentración de DQO en el efluente (g.L⁻¹)

5.1.10 MANEJO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

De acuerdo con el objetivo específico de esta fase de la investigación se definió como un “*estudio prospectivo, longitudinal, observacional y descriptivo*”. Este tipo de estudios cuenta con una población o cohorte, la cual se pretende describir en función de un grupo de variables y respecto de la cual no existen

hipótesis centrales. Quizás se tiene un grupo de hipótesis que se refieren a la búsqueda sistemática de asociaciones entre variables dentro de la misma población (Méndez, 2001). Así, la población de este estudio son el conjunto de datos de las variables fisicoquímicas que caracterizaron el desempeño del RA y RM. En el caso del RA la población o cohorte objeto de estudio estuvo expuesta a la misma condición durante el tiempo de observación, por lo que su evaluación se enfocó en conocer y analizar su evolución en función de las variables de respuesta. Mientras que para el RM los datos o población se agruparon formando pequeñas cohortes en función de cada TRH. La variabilidad de los resultados se analizó a través de series de tiempo y diagramas de cajas y alambres, usando las herramientas de Microsoft Excel y el software Minitab 18.

5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados y discusión se abordan analizando el desempeño individual de los dos reactores. Así, primero se evalúa la fase acidogénica (RA) a través del monitoreo de la producción de hidrógeno en su fase gaseosa y del monitoreo de las variables fisicoquímicas (AGV y DQO) en la fase líquida. Segundo, se analiza el arranque del RM, para lo cual inicialmente se presenta una comparación estadística entre la composición del efluente RA y afluente RM. Esta comparación fue necesaria para establecer el efecto que tuvo el tiempo de recolección sobre la composición fisicoquímica del efluente RA. Luego, se analiza el desempeño del RM en cada uno de los TRH evaluados, para lo cual se tuvo en cuenta el comportamiento de las variables fisicoquímicas en la fase líquida (pH, AB, AGV, DQO y SST) y la producción de biogás y metano en la corriente gaseosa. Tomando en consideración la fluctuación en la composición del afluente RM, el análisis fue abordado a partir de la carga aplicada, efluente y removida, particularmente de las variables relacionadas con la materia orgánica (DQO y AGV) y SST.

Finalmente, se acoplan los resultados de los dos reactores para analizar el desempeño global del sistema. De manera general, los resultados indicaron que después de un tiempo de operación (85 días) en el RA no hubo producción neta de hidrógeno y se contabilizó metano en el biogás. Este cambio en el desempeño sugirió que el RA perdió su característica de reactor hidrogenogénico y, a partir de ese momento se comportó como un digestor anaerobio. Esta condición fue tomada en cuenta durante el análisis del desempeño de los dos reactores. De esta forma, para analizar el desempeño del sistema acoplado, es decir, un sistema compuesto por un reactor hidrogenogénico y un reactor metanogénico, solo se consideró el periodo comprendido entre el día 40 y 85. La selección de este periodo obedece a que el arranque del RM se realizó cuando el RA ya había sido operado durante 40 días y que a partir del día 85 se presentó el cambio en el desempeño del RA. Posterior al día 85, se estableció que el acople entre los dos reactores corresponde a dos reactores anaerobios en serie, en los que cuales el segundo, realiza funciones de un postratamiento, y no como un reactor metanogénico propiamente.

5.2.1 EVALUACIÓN DE LA FASE ACIDOGÉNICA

5.2.1.1 Monitoreo de la producción de H_2 en el RA

El desempeño del RA basado en diferentes variables de respuesta, tales como *la composición del biogás, HY, reducción de carbohidratos (η) y PVH* se ilustra en el Figura 5.5 a-c. Aunque las variables de producción relacionadas con el biogás presentaron una alta variabilidad, se observó que la composición del biogás (Figura 5.5a) durante los primeros 85 d estuvo compuesta por una mezcla entre H_2 y CO_2 y después el contenido de H_2 fue reemplazado por CH_4 . Este comportamiento señala que, hasta ese día el RA se desempeñó como un reactor hidrogenogénico o hidrogenador y luego, su desempeño puede interpretarse como el de un digestor anaerobio en una fase, en el que predominó la formación de metano. Este resultado sugiere que el efecto inicial del pretratamiento térmico del inóculo junto con las condiciones operacionales

y el ambiente acidogénico no fueron suficientes para evitar a mediano plazo la recuperación de la actividad biológica de las arqueas metanogénicas. Entre el día 95 y 125, con el fin de disminuir la producción de metano e intentar reestablecer la fase acidogénica, se redujo la adición del fosfato de sodio. De esta manera, se propició al interior del RA una condición ácida desfavorable para la actividad de arqueas metanogénicas, teniendo el cuidado de no llegar hasta valores de pH inferiores a 4,5 que de acuerdo con Infantes *et al.* (2011), pudieran resultar inhibitorios para las BPH. Así, en el periodo citado el pH afluente tomó un valor promedio de 4,8, y en el medio de reacción predominaron valores entre 5,0 y 5,3, tal como se ilustra a través del mapa de contornos presentado en la Figura 5.6. Como resultado, hacia el día 105 de operación se observó una recuperación incipiente del HY (Figura 5.5b). Sin embargo, la estrategia implementada no fue suficiente para restituir la producción de hidrógeno en el reactor y, por el contrario, aún con bajos valores de pH dentro del RA la producción de metano continuó.

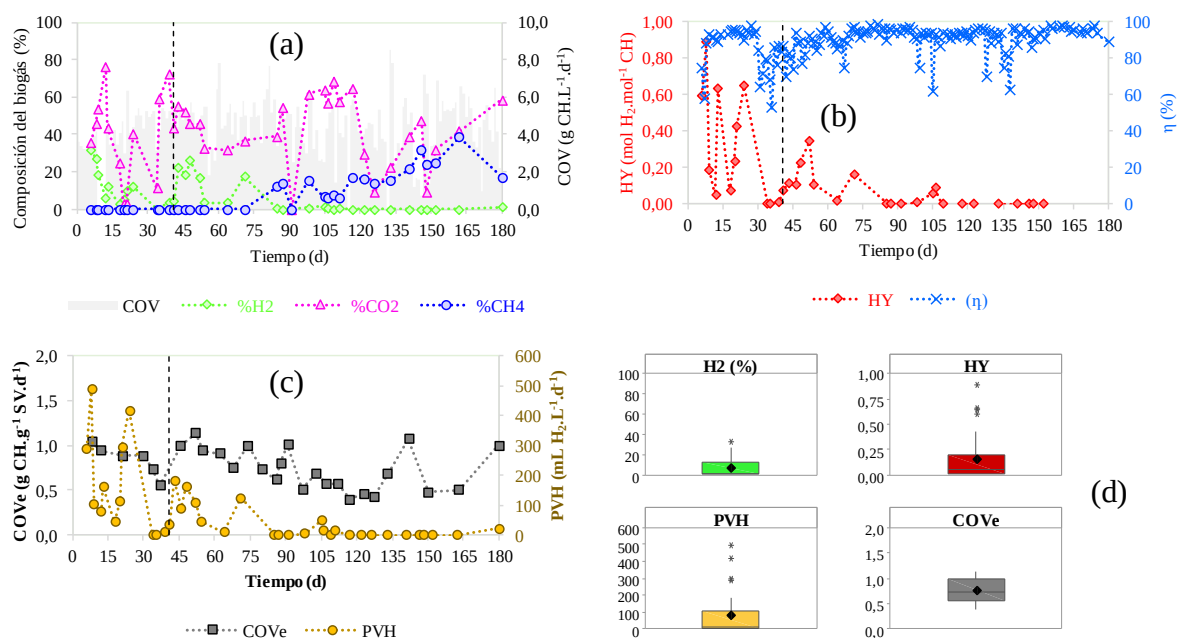


Figura 5.5 Desempeño del RA basado en diferentes variables de respuesta: (a) Composición del biogás, (b) rendimiento de hidrógeno (HY) y reducción de carbohidratos (η), (c) Carga orgánica volumétrica específica (COVe) y tasa de producción volumétrica de hidrógeno (PVH), y (d) Box-plot de H₂ (%), HY, PVH y COVe

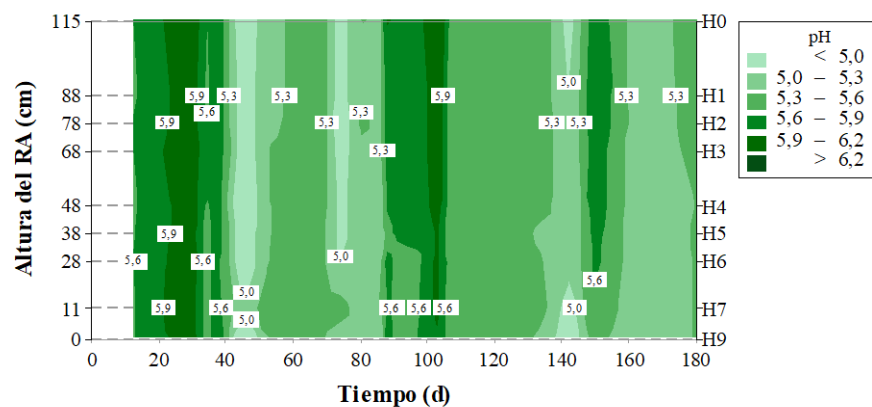


Figura 5.6 Comportamiento del pH al interior del RA

La principal diferencia operacional de este RA, respecto al RA del capítulo anterior, en cual no se observó producción de metano fue el TRH y el tiempo de operación. En esta evaluación el TRH y tiempo

de operación fueron de 8 h y 185 días, respecto a 10 h y 62 d de la evaluación anterior. El menor TRH seleccionado se realizó considerando la hipótesis que a menor TRH mayor es la probabilidad de que ocurra el efecto de lavado de arqueas metanogénicas, debido a su baja tasa de crecimiento. Sin embargo, el menor TRH adoptado no fue suficiente para alcanzar el lavado esperado y probablemente, por el tiempo transcurrido ocurrió un recrecimiento de arqueas metanogénicas como resultado de un largo periodo de adaptación, en el cual los metanógenos fueron capaces de recobrar su actividad metabólica aún en condiciones ambientales adversas, es decir, en un medio ácido. Resultados similares han sido reportados por [Kotsopoulos et al. \(2006\)](#), [Castelló et al. \(2009\)](#) y [Carrillo-Reyes et al. \(2012\)](#) en procesos de fermentación oscura con pH de operación en torno de 5,0. Otra hipótesis que podría explicar el cambio en el desempeño del RA, es el planteamiento de [Si et al. \(2015\)](#), quienes manifiestan que los GPH pueden formar una estructura similar a los gránulos metanogénicos, y que las BCH pueden estar rodeadas o protegidas por las BPH formando un estrecho consorcio sintrófico difícil de romper, aún con un TRH relativamente bajo, en su caso observaron la producción de metano en un proceso de fermentación oscura operando un reactor UASB con un TRH de 8 h. La hipótesis anterior, será retomada en los párrafos siguientes, cuando se presente la evolución de los gránulos en el RA, y podría explicar la reaparición de estos organismos en el RA después de haber demostrado su inactividad a través de una prueba de AME realizada sobre el inóculo pretratado térmicamente.

Se considera que para este estudio, eliminar por completo la adición del *buffer de fosfatos* a partir del periodo en el cual se inició la producción de metano, hubiese generado una disminución del pH dentro del RA, a valores entre 4,0 y 4,5, que de acuerdo con [Wang et al. \(2007\)](#), podrían suprimir efectivamente la producción de metano. Sin embargo, es importante denotar que la producción de hidrógeno a valores de pH menores a 4,0 solo ha sido reportada en casos muy específicos, en los que participan otras especies, además de bacterias del género *Clostridium* y *Enterobacter* ([Xing et al., 2008](#), [Tähti et al., 2013](#), [Carosia et al., 2017](#)). Solo estudios recientes, como el de [Mota et al. \(2018\)](#) han reportaron la producción fermentativa de hidrógeno a pH 3,0, gracias al crecimiento de bacterias del género *Ethanoligenens sp* tolerantes a ambientes muy ácidos. Por lo tanto, solo a través de estudios en flujo continuo sin la adición del alcalinizante se podría establecer el verdadero efecto del pH extremadamente ácido sobre el HY y el control de arqueas metanogénicas.

Por otro lado, durante el periodo en el cual el RA se desempeñó como un reactor hidrogenogénico, el máximo contenido de H_2 fue 35%, la máxima PVH fue $491 \text{ mL } H_2 \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$, y el mayor HY fue $0,9 \text{ mol } H_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ CH}$. Independientemente de la variabilidad en el HY, la reducción de carbohidratos fue alta ($90 \pm 8,4\%$), incluso en el periodo que no hubo producción neta de hidrógeno. La alta eficiencia en reducción de carbohidratos desacoplada de la producción de H_2 ya había sido observada en la etapa anterior (Capítulo 4) y también ha sido reportada por [Park et al. \(2015\)](#) y [Kumar et al. \(2016\)](#) operando un CSTR alimentado con galactosa y TRH de 24 h y 3 h, respectivamente. En sus investigaciones, los autores citados reportaron la producción de ácido láctico, propiónico y fórmico entre otros, durante los periodos en los que no hubo producción de hidrógeno, esos subproductos son indeseables durante la fermentación oscura debido que es reconocido su efecto inhibitorio sobre el HY ([Kim et al., 2012b](#)). Los resultados alcanzados por los anteriores autores inducen a afirmar que, para el presente estudio, el periodo durante el cual el RA dejó de producir hidrógeno pudo ser motivado por un cambio en las rutas metabólicas de las BPH.

Respecto a la COVe, el control de esta variable se logró a través del monitoreo continuo del contenido y distribución de sólidos (SV) dentro del RA, especialmente en la zona de lodos. La Figura 5.7 muestra que, durante el periodo de evaluación, la biomasa se mantuvo expandida entre H9 y H3. La concentración de la biomasa presentó una estratificación en sentido del flujo, así las mayores concentraciones de lodo se registraron entre H9 y H7 (entrada del sustrato). A diferencia de la etapa anterior, en este RA fue necesario realizar purgas o extracción de lodo para regular el contenido de biomasa y así,

mantener el control sobre la COVe. Este aspecto se atribuye al incremento en la tasa de crecimiento específica estimulada por un aumento en la carga orgánica aplicada equivalente al 20%, como consecuencia de la disminución del TRH de 10 h a 8 h respecto a la etapa anterior. De acuerdo con [Chen *et al.* \(2001\)](#), la tasa de crecimiento máximo de las BPH es de $0,172 \text{ h}^{-1}$, por lo que se recomienda operar los RA (tipo UASB) con un TRH mínimo de 5.8 h ([Carrillo-Reyes *et al.*, 2012](#)). Por lo tanto, al disminuir el TRH se operó el RA en una condición más cercana al límite en el cual las BPH expresan su máximo crecimiento, lo que motivó el incremento en la extracción de lodo para controlar la COVe.

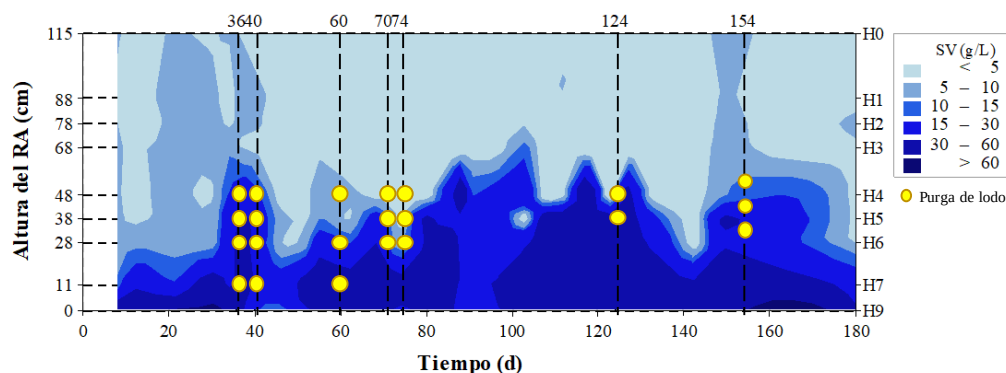
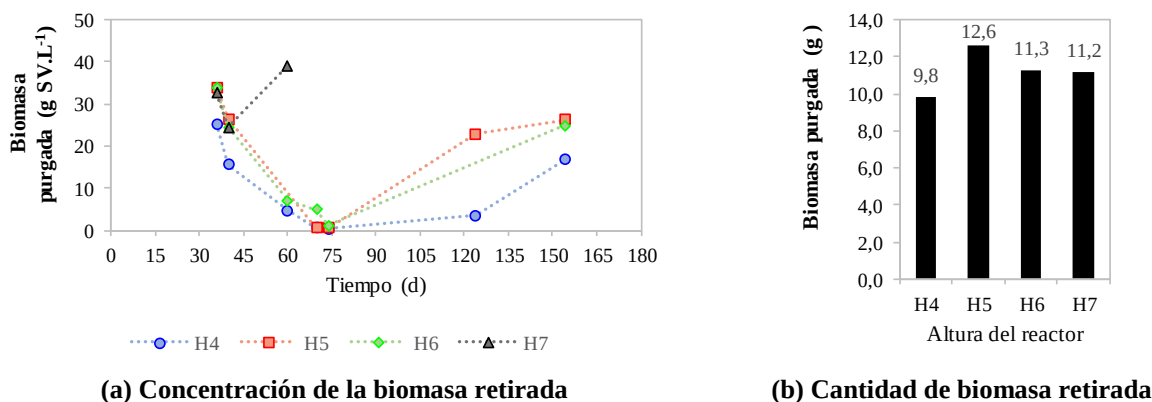


Figura 5.7 Distribución de biomasa dentro del RA

Con relación a la descarga de biomasa o purga de lodos (Figura 5.8), esta se realizó de forma gradual extrayendo volúmenes inferiores a 100 mL para evitar una descompensación del RA. Por lo que, para controlar la biomasa se retiraron volúmenes a través de las válvulas de purga denominadas H4, H5, H6 y H7. La cantidad de biomasa retirada en cada válvula de purga fue similar para evitar la desestabilización del reactor y mantener la distribución de sólidos (Figura 5.8b).



(a) Concentración de la biomasa retirada

(b) Cantidad de biomasa retirada

Figura 5.8 Biomasa retirada en el RA

De acuerdo con [Fuess *et al.* \(2016\)](#), la extracción de biomasa es una estrategia operacional que ayuda a recuperar la estabilidad de los reactores productores de hidrógeno debido a que permite el descarte de bacterias no productoras de hidrógeno, que a mediano y largo plazo, pueden establecerse en estos reactores indicando un envejecimiento de la biomasa. Sin embargo, sus resultados al igual que lo observado en esta investigación, demuestran que esta estrategia no es suficiente para renovar la biomasa productora de hidrógeno. Por lo que sugieren acompañar esta estrategia operacional con otras orientadas a crear un entorno desfavorable para las BCH, como son un estricto control sobre el pH efluente y la aplicación constante de altas cargas orgánicas.

Por otro lado, el aumento de la velocidad ascensional del flujo promovido por la disminución del TRH tuvo el efecto deseado con relación a la formación de gránulos, la evolución de su formación se presenta en la Figura 5.9, en ella se observa que el lodo rápidamente comenzó a aglutinarse para formar pequeños gránulos que fueron visibles desde los primeros días. Pero, fueron requeridos cerca de 100 d para la formación de gránulos consistentes, mostrando que la formación de gránulos en RA es un proceso lento. Un tiempo similar (80 d) fue requerido por [Fang et al. \(2002\)](#) para que el lodo flocúleno se convirtiera en GPH en condiciones de operación de 26°C, pH de 5,5 y TRH de 6 h.

Los gránulos formados presentaron una apariencia densa y bien definida, sin embargo, estos se rompían al pasar por las válvulas de purga, por lo que no fue posible extraerlos del RA para una caracterización exhaustiva. A pesar de su poca compactación, presentaron un tamaño entre 3,0 y 5,0 mm (aprox.) con una coloración blanca cremosa. De acuerdo con [Salem et al. \(2017\)](#), esa coloración es propia de GPH que se forman en reactores operados con bajos TRH, debido a que esa condición operacional, por un efecto de lavado, elimina la actividad de bacterias sulfato reductoras, las cuales son responsables de la coloración oscura de los lodos anaerobios metanogénicos.

Aunque no fue posible demostrar una correlación directa entre la formación consistente de los gránulos, observada hacia el día 98 (Figura 5.9) y la creciente producción de metano, observada a partir del día 105 (Figura 5.5a), es probable que el notable incremento en el tamaño de los gránulos que se observó entre el día 98 y 160 (Figura 5.9) le haya otorgado mayor protección a las BCH (productoras de metano), permitiendo su establecimiento en condiciones ambientales que naturalmente son adversas para su crecimiento. Por lo tanto, se considera que esta pudo ser la causa principal por la cual las estrategias empleadas, extracción de biomasa y disminución del pH, no hayan tenido el efecto deseado sobre el control de BCH y resurgimiento de BPH. Esta hipótesis se fundamenta en lo previamente expuesto por [Si et al. \(2015\)](#), con relación a la protección que pueden ofrecerle las BPH a las BCH durante la formación de GPH. Tomando en consideración esta hipótesis, se podrían adoptar estrategias complementarias como la recomendada por [Kotsopoulos et al. \(2006\)](#) para prevenir el establecimiento de metanógenos durante la formación de GPH, la cual consiste en adicionar un inhibidor de la metanogénesis, como el *bromoetanosulfonato de sodio* (BES), solo durante el periodo de arranque de los RA.

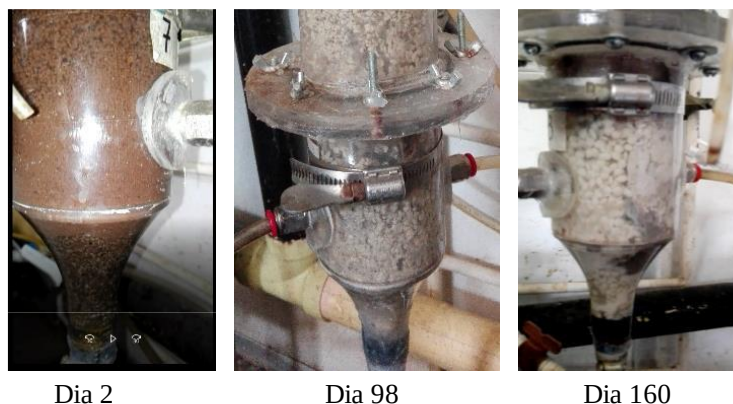


Figura 5.9 Evolución de la formación de gránulos en el RA

5.2.1.2 Monitoreo de la fase líquida en el RA

En las Figura 5.10 y 5.11 se presenta el comportamiento de la fase líquida del RA en función de los AGV y DQO. La presencia de AGV en el afluente (Figura 5.10) indica que el proceso de acidificación del sustrato inició durante la etapa de elaboración del agua residual; ese comportamiento es típico del proceso agroindustrial a escala real, en el cual, en los tanques o canales de sedimentación sucede la acidificación

natural del sobrenadante (Hasan *et al.*, 2015). La concentración de AGV presentó variabilidad, tanto en el afluente como en el efluente, con mayores valores en este último. Esta tendencia indicó que tuvo lugar un proceso de producción o generación de AGV, con una alta variabilidad ($49,1 \pm 51,7 \%$), incluso después del día 85, a partir del cual en la fase gaseosa fue observada la producción de metano. Este comportamiento induce a pensar que los AGV no fueron utilizados como sustrato principal para la producción de metano a través de la ruta acetoclástica. De acuerdo con Carrillo-Reyes *et al.* (2014) y Si *et al.* (2015), la producción de metano en reactores productores de hidrógeno es debida a la actividad hidrogenotrófica debido a que estos metanógenos son más tolerantes a las condiciones ácidas (pH desde 3,8 hasta 5,0) que los acetoclásticos. Por lo que, es probable que la metanogénesis hidrogenotrófica haya sido la ruta predominante responsable de la producción de metano en el RA.

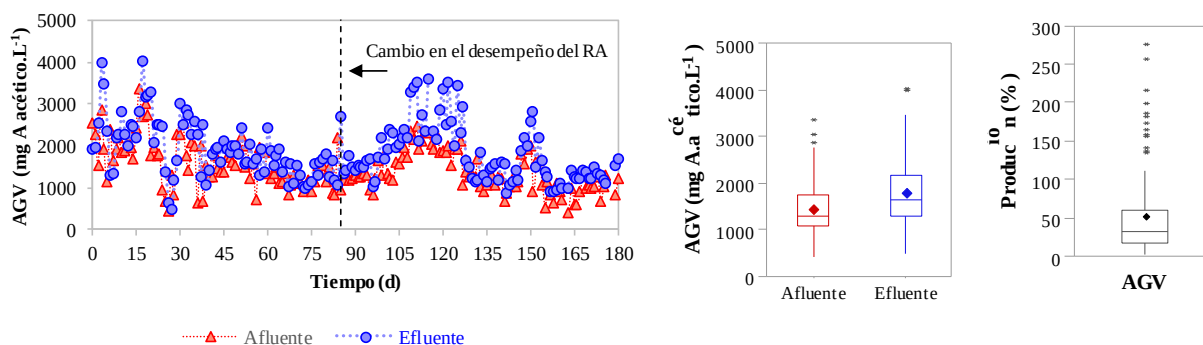


Figura 5.10 Comportamiento de los AGV

Adicionalmente, la producción de AGV a partir del momento en el cual no se registró producción neta de H_2 , puede atribuirse tanto a la fermentación homoacetogénica como a la ocurrencia de rutas metabólicas no productoras de hidrógeno, relacionadas con la producción de ácidos tales como láctico, propiónico y valérico. Arooj *et al.* (2008) observaron un incremento del 54% en la producción de acetato a partir del consumo del hidrógeno, cuando redujeron el TRH de 9 a 6 h en un CSTR utilizando almidón como sustrato. Estos autores indicaron que a medida que se reduce el TRH se iguala la producción de acetato a través de ruta homocetogénica con la producción de acetato a partir de la producción de hidrógeno, por lo tanto, no observaron una producción neta de hidrógeno. De esta manera, se podría explicar porque después del día 85, el nivel de AGV en el efluente fue superior al afluente, indicando que además de los AGV que se pudieron producir a través de rutas metabólicas no productoras de hidrógeno, también algún contenido de acetato derivado de la fermentación homoacetogénica, pudo ser cuantificado como AGV a través del método de determinación de AGV.

En la Figura 5.11 se observa que la DQO en el afluente presentó una alta variabilidad, la cual se reflejó en el efluente. Aún con la variación observada en el afluente, se puede indicar que los valores de la DQO corresponden a lo reportado para agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, tal como lo señalan autores como Rojas-Chacón (1999), Colin *et al.* (2007), y Perez *et al.* (2009). El desempeño global indicó que el RA obtuvo una reducción media de DQO de $21,9 \pm 14,0 \%$. Este bajo nivel de reducción de DQO es característico de procesos de fermentación oscura (Kumar *et al.*, 2016) debido a que una fracción de la materia orgánica es transformada en AGV, los cuales contienen átomos de carbono que todavía se pueden oxidar, ejerciendo por lo tanto DQO.

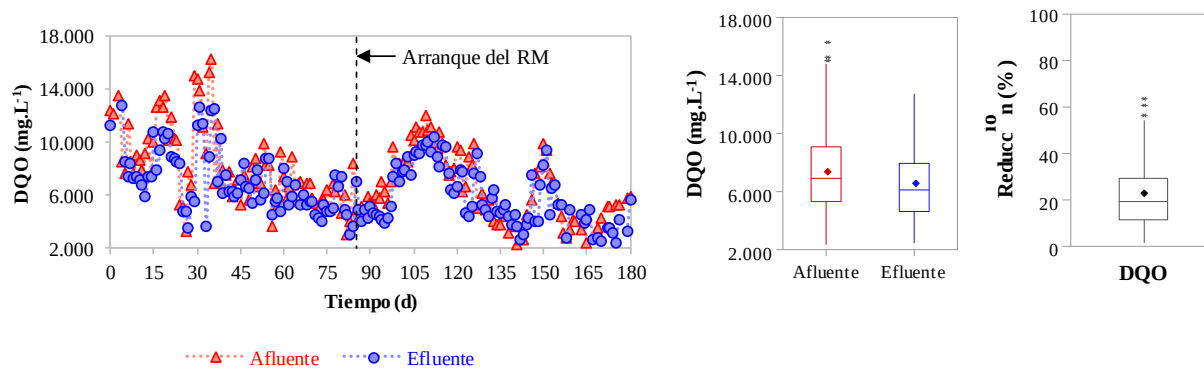


Figura 5.11 Comportamiento de la DQO

En la Tabla 5.6 se presenta un resumen estadístico descriptivo del desempeño del RA, antes y después del día 85 en función de la reducción de DQO y producción de AGV. Un análisis estadístico de comparación de medias (prueba T-student-t), indicó que los valores medios no difieren en un nivel de significancia de 0,05. Este resultado permite soportar la hipótesis anterior, en la cual la producción de metano después del día 85 es atribuida a la metanogénesis hidrogenotrófica, debido a que no hay evidencia suficiente que soporte una alta reducción de DQO y AGV que pueda asociarse con metanogénesis acetoclástica. Adicionalmente, la producción de AGV entre el día 85 y 180, sugiere la ocurrencia de rutas metabólicas de tipo acidogénico no productoras de hidrógeno, que involucran el uso de electrones disponibles para producir compuestos reducidos como ácido propiónico y ácido láctico (Zhang y Yang, 2009).

Tabla 5.6 Resumen estadístico del desempeño del RA en la fase líquida

Variable	Periodo (d)	N	Media	Desv.Est.	Mínimo	Máximo
Reducción de DQO (%)	Entre 1 y 85	55	22,8	14,7	1,4	62,8
	Entre 85 y 180	54	21,0	13,4	1,1	54,1
Producción de AGV (%)	Entre 1 y 85	65	50,4	54,2	1,1	273,7
	Entre 85 y 180	76	48,0	49,9	1,0	215,1

Del análisis del desempeño del RA se puede concluir parcialmente que es factible la producción biológica de hidrógeno en reactores de crecimiento auto-inmovilizado con control sobre la biomasa y que la configuración del RA evaluado facilita el control de la COVe. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales relacionados con las condiciones operacionales para evitar el recrecimiento de arqueas hidrogenotróficas en los GPH y mejorar el HY, para lograr, a largo plazo, una producción estable de hidrógeno a partir del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. Probablemente, la reducción o eliminación a largo de plazo de metanógenos de lento crecimiento consumidores de hidrógeno se logre a través del efecto sinérgico de diferentes estrategias operacionales. Entre ellas, la disminución del TRH para incentivar el efecto de lavado de BCH, la reducción del pH de operación a través de la eliminación del *buffer* de fosfato, una vez que se haya establecido en el reactor una población de BPH y/o la adición de un inhibidor de la metanogénesis solo durante el arranque del RA.

5.2.2 EVALUACIÓN DEL ARRANQUE DEL RM

La evaluación de la fase metanogénica se realizó a través del análisis de la composición del sustrato afluente RM y la evolución del proceso de arranque del RM. El sustrato afluente RM correspondió con el efluente RA. Debido a las características ácidas que presentó este efluente (valores de pH inferiores a la neutralidad) fue necesario acondicionar su pH hasta un valor cercano a la neutralidad para evitar el

establecimiento de un medio ácido en el RM que pudiese interferir en el desempeño de las arqueas metanogénicas. Las demás características fisicoquímicas del efluente RA (DQO, AGV, ST, SV y nutrientes) no fueron alteradas, por lo que el RM recibió un sustrato con una composición variable que dependió de la dinámica del RA. La evolución del proceso de arranque del RM estuvo influenciada por la disminución gradual del TRH en función del desempeño o respuesta del RM con relación a la reducción de DQO y SST.

5.2.2.1 Composición del afluente RM (Efluente RA)

De acuerdo con Chernicharo (2007), la DA es particularmente susceptible al control riguroso de las condiciones ambientales y los microorganismos metanogénicos son considerados los más vulnerables a esas condiciones. De este modo, conocer la composición fisicoquímica del sustrato incrementa las probabilidades de éxito del arranque de un reactor anaerobio debido a que se pueden identificar aquellas variables que en determinadas concentraciones pueden resultar nocivas para la actividad microbiana, o suministrar aquellas que por su ausencia también resulten inhibitorias. El análisis de la composición fisicoquímica del sustrato afluente al RM se realizó en función de la variación del pH, AB, DQO, AGV, sólidos (ST, SV y SST) y nutrientes.

En la Figura 5.12 se observa que la alta variabilidad que presentó el pH del efluente RA fue estabilizada a través de la adición de bicarbonato de sodio (NaHCO_3). De esta manera, el sustrato que ingresó al RM presentó una baja variación en el pH, en un rango entre 7,1 y 7,3, próximo a la neutralidad y cercano al rango (pH entre 6,8 y 7,2) en el cual las arqueas metanogénicas expresan un mejor desempeño (Appels *et al.*, 2008). El mantenimiento de una variación mínima del pH del afluente RM se realizó con la intención de generar estabilidad en el sistema durante el arranque del RM, debido a que el pH es una de los parámetros que mayor incidencia puede tener sobre la actividad metabólica de los microorganismos formadores de metano.

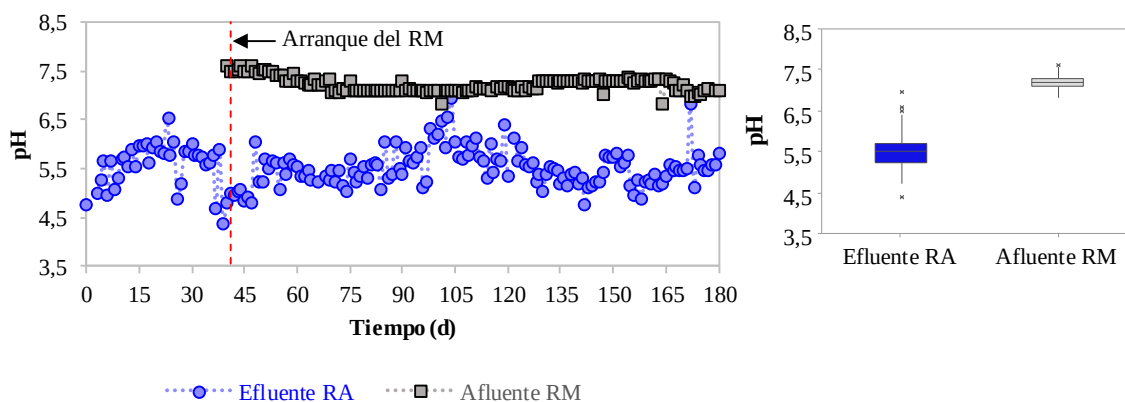


Figura 5.12 Variación del pH en el efluente del RA y afluente al RM

Naturalmente, la adición del bicarbonato de sodio para la corrección de pH tuvo un efecto notable sobre la AB del sustrato afluente al RM con relación al efluente RA (Figura 5.13). La AB del afluente al RM presentó un valor de $3.500 \pm 2.348 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, su alta variabilidad obedeció no solo a la variación del pH del efluente RA, sino a la demanda de alcalinizante necesaria para neutralizar los AGV. Algunos autores recomiendan un rango de AB entre 500 y $3.000 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ para neutralizar la acción de los AGV en procesos de DA en una fase, alimentados con agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca (Torres *et al.*, 2005a, Pérez *et al.*, 2006, Perez *et al.*, 2009), en este caso fue necesaria una cantidad mayor de AB para neutralizar los AGV presentes en el sustrato, debido a que este procedía de un RA en el cual el

contenido de AGV fue mayor como resultado de la transformación de materia orgánica representada en carbohidratos. En la Figura 5.13 también se observa que, en el inicio del arranque, la AB fue mayor ($> 3.000 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$) y esta fue disminuyendo progresivamente, este comportamiento que será explicado en mayor detalle en el ítem 5.2.2.2, puede ser entendido en función de la evolución del establecimiento de las condiciones metanogénicas estables. El contenido de AB en el inicio del arranque fue mayor debido a que en ese momento los AGV provenientes del RA solo podían ser neutralizados a través de la adición externa de un alcalinizante y, a medida que estos ácidos fueron consumidos en el RM por las arqueas formadoras de metano, se liberó AB dentro del RM resultando en la disminución del requerimiento del alcalinizante externo. La reducción de la adición de alcalinizante en el afluente RM le imprimió un menor contenido de AB.

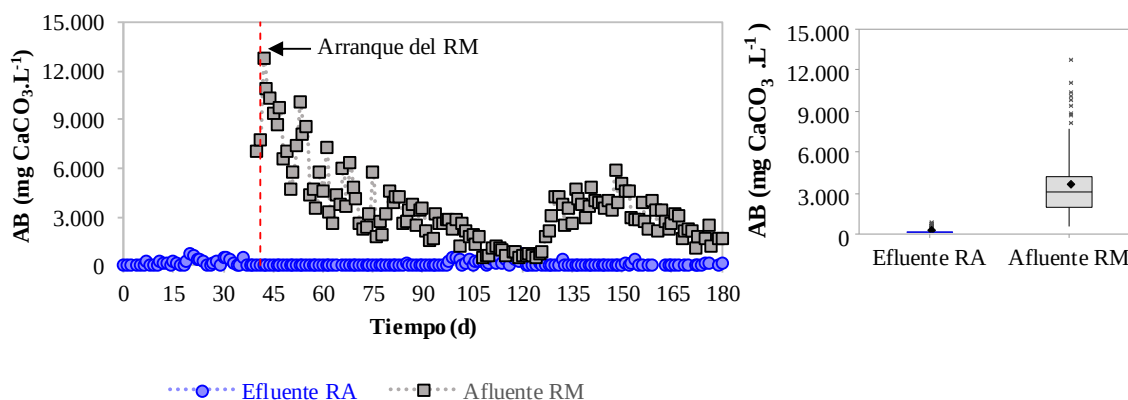


Figura 5.13 Variación de la alcalinidad bicarbonática (AB) en el efluente del RA y afluente al RM

La concentración de AGV en el efluente RA presentó un valor de $1.861 \pm 700 \text{ mg A. Acético} \cdot \text{L}^{-1}$ y en el afluente RM el valor fue $1.729 \pm 638 \text{ mg A. Acético} \cdot \text{L}^{-1}$. Aunque el comportamiento en la variación de los datos para RA y RM guardó una gran similitud (Figura 5.14), es probable que la diferencia en los valores medios se deba al tipo de muestra. La primera corresponde con una muestra puntual recolectada en la salida del RA y la segunda, es una muestra recolectada en el balde de alimentación, después de almacenar durante 24 el efluente del RA, semejante a una muestra de tipo compuesta en la cual se homogeniza la concentración de las sustancias.

De acuerdo con [Rojas \(1999\)](#), los principales AGV que se forman en un RA alimentado con agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca son ácido acético (50%), propiónico (30%) y butírico (20%). En concentraciones elevadas los AGV se convierten en sustancias tóxicas inhibitorias de la actividad metanogénica ([Franke-Whittle et al., 2014](#)). [Wang et al. \(2009\)](#) indican que tanto el ácido acético como el ácido butírico en concentraciones superiores a 2.400 y $1.800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectivamente, inhiben la producción de metano, pero que esta actividad se recupera cuando descienden las concentraciones. Mientras que niveles de ácido propiónico del orden de $900 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ tienen un efecto nocivo del cual los metanógenos no son capaces de recuperarse. Teniendo en consideración los reportes anteriores es posible argumentar que sí el ácido propiónico estuvo presente en un porcentaje menor al 50% en los AGV del afluente RM, el contenido de AGV no tuvo un efecto inhibitorio para el establecimiento de las arqueas metanogénicas, debido a que el contenido total de AGV no superó las concentraciones máximas inhibitorias reportadas para el ácido acético y ácido butírico.

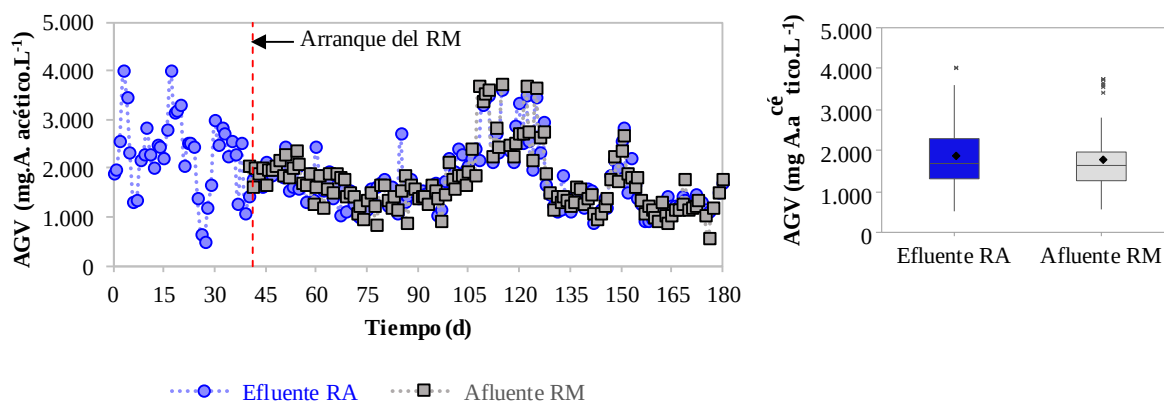


Figura 5.14 Variación de los AGV en el efluente RA y afluente RM

De otro lado, la materia orgánica presente en el sustrato afluente RM, determinada a través de la DQO presentó un valor medio de $5.425 \pm 2.055 \text{ mg.L}^{-1}$. Aunque se observó una diferencia cercana al 20% respecto a la DQO del efluente RA ($6.450 \pm 2.333 \text{ mg.L}^{-1}$) (Figura 5.15), esta pudo ser causada por el tipo de muestra, tal como se explicó previamente para los AGV, los cuales presentaron un comportamiento similar.

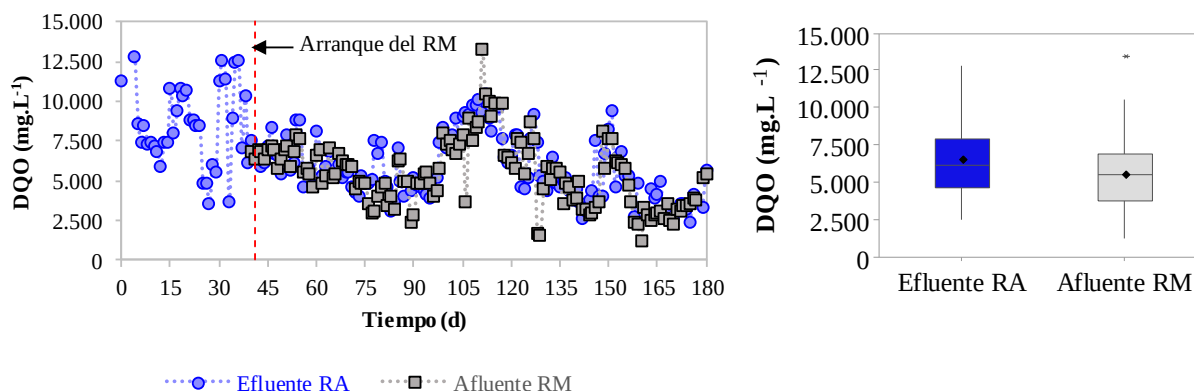


Figura 5.15 Variación de la DQO en el efluente RA y afluente RM

El contenido de DQO y AGV de las dos muestras presentaron una correlación lineal próxima a 0,50 (Figura 5.16), lo que indica que el 50% de la materia orgánica presente en el sustrato afluente al RM estaba representada principalmente por AGV, incluso cuando el RA cambió su desempeño después del día 85. Este comportamiento indica que no hay un cambio significativo en la distribución de materia orgánica en el efluente RA derivado del cambio en el desempeño del RA. El otro porcentaje se relacionó con sólidos que no fueron retenidos ni transformados en el RA, así con biomasa que pudo sobrepasar la zona de sedimentación y salir en el efluente RA.

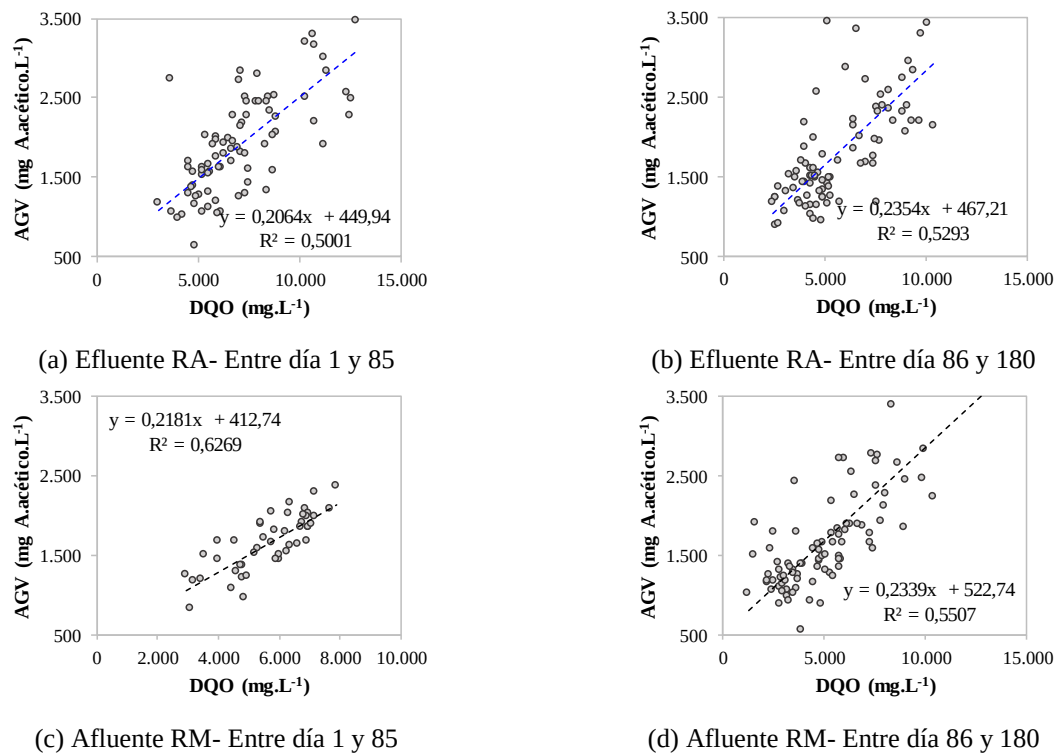


Figura 5.16 Correlación lineal entre DQO y AGV

En la Figura 5.17 se presenta la variación de sólidos en el efluente RA y afluente RM. Inicialmente, en la Figura 5.17a se observa un incremento cercano al 40% entre la concentración de ST en la afluente RM respecto al efluente RA, los valores medios fueron $5.525 \pm 2.014 \text{ mg.L}^{-1}$ y $9.203 \pm 3.076 \text{ mg.L}^{-1}$ respectivamente. Aunque es probable que esta diferencia sea influenciada por el tipo de muestra, tal como se explicó anteriormente con relación a la DQO, también la adición del bicarbonato de sodio pudo haber incrementado la concentración de ST, particularmente la fracción inerte (sólidos disueltos).

Con relación a los SV, las dos tipos de muestras presentaron valores de $3.411 \pm 1.719 \text{ mg.L}^{-1}$ (Efluente RA) y $4.134 \pm 1.494 \text{ mg.L}^{-1}$ (efluente RM) (Figura 5.17b), el incremento que es cercano al 20% se atribuye a biomasa floculenta que pudo ser arrastrada por el flujo del líquido. Por su parte los SST presentaron un valor medio de $718 \pm 497 \text{ mg.L}^{-1}$ y $403 \pm 270 \text{ mg.L}^{-1}$ respectivamente.

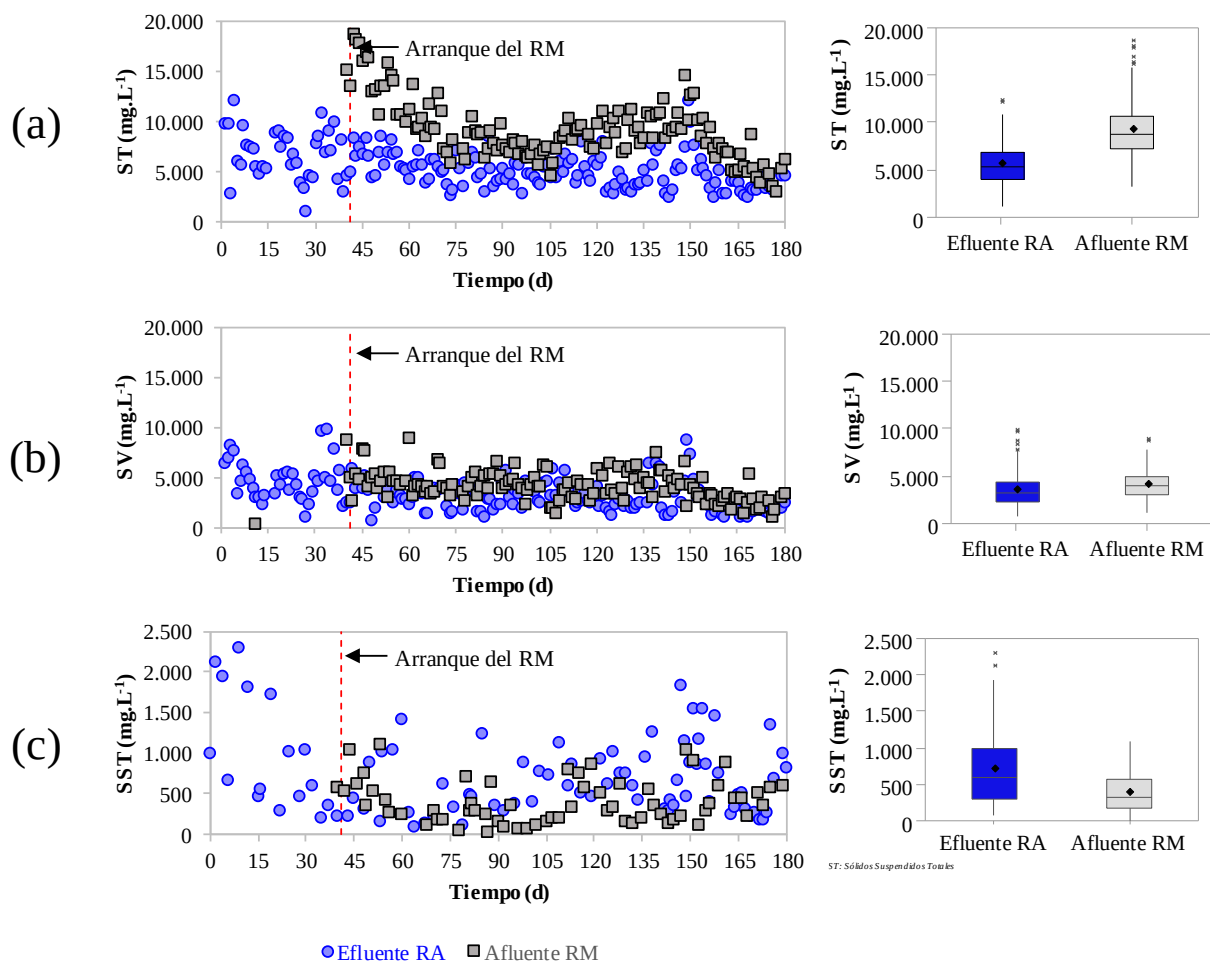


Figura 5.17 Variación de sólidos en el efluente RA y afluente RM. (a) Sólidos Totales (ST), (b) Sólidos Volátiles (SV) y (c) Sólidos Suspendidos Totales (SST)

En la Figura 5.18 se presenta la distribución de sólidos en el afluente al RM, en la cual se observa que los sólidos volátiles que se relacionan con materia orgánica representaron el 46% y los SST que se relacionan con material de tamaño inferior a $0,5\mu\text{m}$ de tipo orgánico y/o mineral representaron una fracción muy baja, tan solo el 5%.

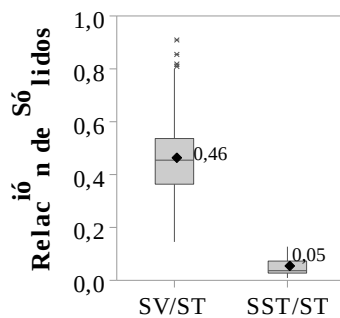


Figura 5.18 Distribución de sólidos en el afluente RM

De esta manera se puede inferir que la fracción faltante (49%) estaba relacionada con sólidos disueltos, los cuales podrían estar asociados a sales cuya presencia se debe a la adición de fosfato de sodio y bicarbonato de sodio, que fueron las sustancias químicas utilizadas para corregir el pH tanto en el afluente al RA como en el afluente al RM respectivamente.

El aporte al contenido de sales disueltas en el afluente RM, estimado a partir de la adición del bicarbonato de sodio es presentado en la Figura 5.19. En esa Figura se observa que en el inicio del arranque del RM estas sales fueron cercanas a $5,0 \text{ g Na}^+ \cdot \text{L}^{-1}$, pero rápidamente descendieron hasta obtener una concentración media de $1,68 \pm 1,03 \text{ g Na}^+ \cdot \text{L}^{-1}$. El contenido de sales en altos niveles tiene un efecto desfavorable sobre la DA, debido a que incrementa la presión osmótica ocasionando la deshidratación de las células con lo que la comunidad bacteriana y arqueas metanogénicas mueren (Chen *et al.*, 2008b). De acuerdo con Appels *et al.* (2008), bajas concentraciones de sales son benéficas para el crecimiento de arqueas metanogénicas (menor a $0,35 \text{ g Na}^+ \cdot \text{L}^{-1}$), en concentraciones intermedias, entre $3,5$ y $5,5 \text{ g Na}^+ \cdot \text{L}^{-1}$, el crecimiento es moderado y en concentraciones superiores se afecta su crecimiento. Por lo anterior, es posible argumentar que en general, el aporte de sales, en forma de cationes (Na^+) por la adición del bicarbonato de sodio no tuvo un efecto inhibitorio para el crecimiento de arqueas metanogénicas debido a que no superó los límites inhibitorios. No obstante, el contenido de cationes (Na^+) en el afluente podría haber sido mayor debido a que en el RA se adicionó un *buffer* de fosfato de sodio que podría haber contribuido con el contenido de sales afluentes al RM.

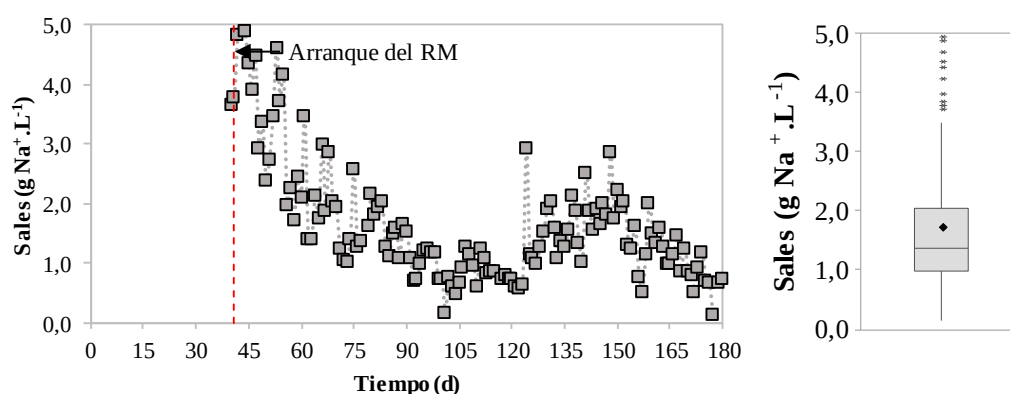


Figura 5.19 Aporte de sales por adición de bicarbonato de sodio

Por otro lado, la cantidad de nutrientes disponibles para la actividad microbiana de los organismos metanogénicos se estableció a partir de la relación DQO:N:P. De esta manera, se observó que la cantidad de nutrientes no varió significativamente entre el efluente RA y afluente RM, este último presentó una relación DQO:N:P de 350:6,5:24,8 equivalente a 100:2,0:5,9 (Figura 5.20). Como se estableció en el capítulo anterior, la alta presencia de fósforo en el efluente acidogénico se atribuye a la dosificación del *buffer* de fosfato. La relación teórica para la descomposición anaerobia de la materia orgánica y producción de biogás es de 100:1:0,4 (Sreethawong *et al.*, 2010, Intanoo *et al.*, 2012). En procesos de DA de una o dos fases, empleando un sustrato similar o relacionado con la extracción de almidón de yuca, se han usado relaciones DQO:N:P de 350:5:1 (Rojas, 1999), 100:2,98:2,03 (Intanoo *et al.*, 2014), 100:1:2,3 (Intanoo *et al.*, 2016) y 100:2,5:0,8 (Chavadej *et al.*, 2019) obteniendo resultados satisfactorios en cuanto a la reducción de materia orgánica y producción de biogás. Por lo tanto, es posible inferir que la relación de nutrientes que presentó el afluente RM era similar a los valores comúnmente utilizados para la metanogénesis y que el sustrato contenía la cantidad suficiente de N y P para el desarrollo de la actividad microbiana.

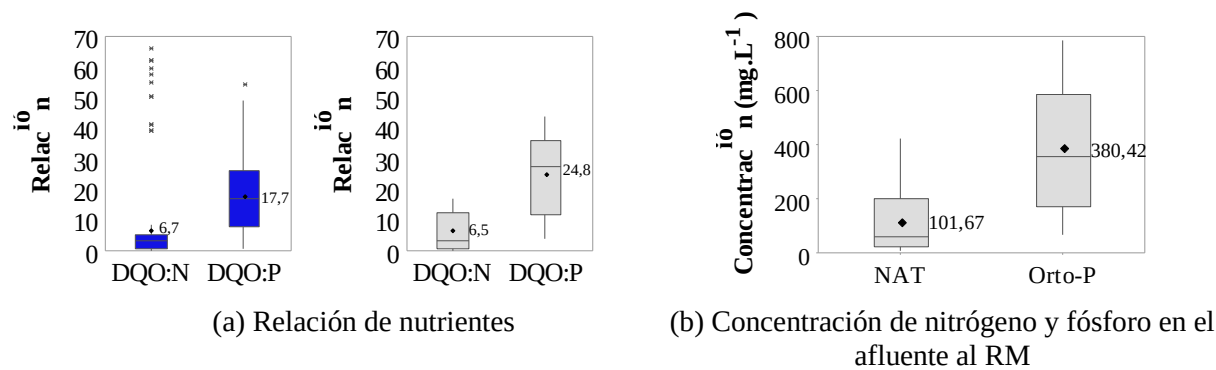


Figura 5.20 Nutrientes disponibles en el afluente RM

Con relación al contenido de nitrógeno en el afluente RM (Figura 5.20b) se observa que la concentración media de NAT fue de $101,67 \pm 111,10 \text{ mg.L}^{-1}$. De acuerdo con lo reportado por [Chen et al. \(2008b\)](#), quienes afirman que las concentraciones de NAT inferiores a 200 mg.L^{-1} son benéficas para la DA, se puede concluir que el NAT fue suficiente para suplir el requerimiento nutricional para el establecimiento de las arqueas metanogénicas durante el arranque del RM.

De manera general, después de analizar la composición fisicoquímica del afluente al RM se concluye que el sustrato contenía los nutrientes orgánicos e inorgánicos requeridos para el crecimiento biológico, y que estos podrían ser usados en el RM para inducir el establecimiento de arqueas metanogénicas durante el proceso de arranque. Adicionalmente, la composición de la materia orgánica, que contenía una fracción importante de AGV podría estimular el desarrollo de la metanogénesis acetoclástica, la cual es la ruta principal que se desea estimular en un RM para la producción de metano.

5.2.2.2 Monitoreo de la fase líquida en el RM

El arranque del RM fue realizado incrementando la carga hidráulica y orgánica, a través de la reducción gradual del TRH. La disminución del TRH fue realizada en porcentajes entre 10 y 30% para evitar sobrecargas hidráulicas que rompieran el equilibrio o causaran una pérdida excesiva de biomasa por efecto de lavado. Además del propósito que comúnmente tiene el arranque de reactores anaerobios que es crecer, acumular y retener una concentración suficiente de biomasa activa y bien equilibrada, el arranque de este RM tenía como propósito secundario identificar la mejor condición de operación con relación al TRH, COV, pH y AB para producir metano a partir del tratamiento (reducción de carga orgánica) del efluente del RA. Adicionalmente, en el análisis del arranque del RM se consideró el efecto que pudo tener el cambio en el desempeño del RA observado partir del día 85, debido a que a partir de ese momento podría tratarse de dos reactores anaerobios en series. La evaluación del arranque del RM tuvo una duración de 140 días contabilizados a partir del momento en que el RA llevaba 40 días de operación. La reducción del TRH desde 48 h hasta 13 h se realizó en función del desempeño del reactor con relación a la reducción de carga orgánica aplicada y producción de biogás.

En la Tabla 5.7 se presenta un resumen de los TRH y las respectivas COV aplicadas. En general, se observa que el arranque del RM se inició con bajas COV, que presentaron gran similitud para los TRH de 48, 44 y 38 h. Posteriormente, la COV aumentó gradualmente debido a la interacción entre la disminución del TRH e incremento no controlado de la DQO en el afluente al RM. Tal como se mencionó previamente, la variación de la DQO fue resultado del desempeño del RA (Figura 5.11), que, aunque en la fase gaseosa indicó un cambio en el proceso dominante por la ocurrencia en la producción de metano a partir del día 85, en la fase líquida, la variación de la DQO estuvo influenciada por la dinámica del sustrato afluente al RA, que presentó fuertes variaciones en el contenido de materia orgánica, determinada como DQO.

El efecto del incremento de la COV por la variación de esos dos parámetros (TRH y DQO) fue observado durante la evaluación del TRH de 15 h, en el cual la COV se duplicó en un corto periodo respecto al TRH anterior. Adicionalmente, fueron monitoreados constantemente el pH, AB y AGV debido a la alta sensibilidad que presentan las arqueas metanogénicas a las variaciones de estos parámetros.

Tabla 5.7 COV aplicadas al RM en cada TRH durante el periodo de arranque

TRH (h)	Duración (d)	Periodo (d)	N	COV (g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)			
				Media	Desv.Est.	Mínimo	Máximo
48	7	40 a 46	7	3,4	0,2	3,2	3,6
44	7	47 a 53	7	3,6	0,3	3,2	4,0
38	14	54 a 67	14	3,8	0,7	2,9	4,9
28	6	68 a 73	6	4,8	0,6	3,9	5,3
20	19	74 a 92	19	5,0	1,3	2,9	7,5
19	18	93 a 110	18	8,3	2,1	4,6	11,3
15	4	111 a 114	4	17,5	3,0	14,9	21,9
17	19	115 a 133	18		3,2	2,3	14,1
16	34	134 a 167	34	6,4	2,6	1,9	12,2
13	13	168 a 180	12	7,2	2,3	4,2	11,7

N: número de datos

Con relación al pH, en la Figura 5.21a se observa que el arranque del RM se inició con valores de pH cercanos a 7,5, lo cual fue debido a la cantidad de AB adicionada para neutralizar los AGV originados en el RA. Durante la mayor parte del tiempo de evaluación, el pH efluente del RM fue superior al pH afluente, lo cual puede ser entendido a través de la formación CO₂ que se deriva de la transformación anaerobia de la materia orgánica, y a la acción del sistema carbonato-bicarbonato que es el sistema ácido-base más importante en la DA ([van Haandel, 1994](#)). Con el progreso del arranque del RM tanto el pH como la AB disminuyeron en el efluente. Así, el pH efluente fluctuó entre 7,0 y 8,0, valores considerados adecuados para el establecimiento de las arqueas metanogénicas ([Appels et al., 2008](#)). En general, a través de la variación del pH se puede inferir que la actividad enzimática al interior del RM no fue condicionada por el pH, debido a que en el rango en que se estableció se eliminó el riesgo de inhibición de la metanogénesis ([Chernicharo, 1997a](#)).

Entre los días 106 y 127, cuando estaba finalizando la evaluación del TRH de 19 h y durante el TRH de 15 h, el pH efluente presentó valores inferiores al afluente indicando que se había roto el equilibrio en el sistema carbonato. Ese periodo coincidió con los valores más bajos de AB y el mayor contenido de AGV en el efluente RA. Aunque en este periodo el RA había mostrado un cambio hacia la producción de metano, la fase líquida se caracterizó por un incremento en los niveles de AGV en el efluente RA (afluente RM), indicando que no había actividad de arqueas metanogénicas consumidoras de acetato en el RA. Por lo que, el RA presentó una acumulación de AGV, tanto por los que entraron al reactor en el afluente como por los que fueron producidos a partir de la transformación de los carbohidratos. Así, el desequilibrio observado en el pH del RM se atribuye a un exceso de AGV en el afluente al RM (sobre carga orgánica), que superó la tasa de consumo de las arqueas metanogénicas. Para superar la inestabilidad en el RM, reflejada posteriormente a través de la alteración de los índices de alcalinidad, el TRH fue rápidamente incrementado a 17 h. Así, los valores de pH efluente se incrementaron y se reestableció el equilibrio.

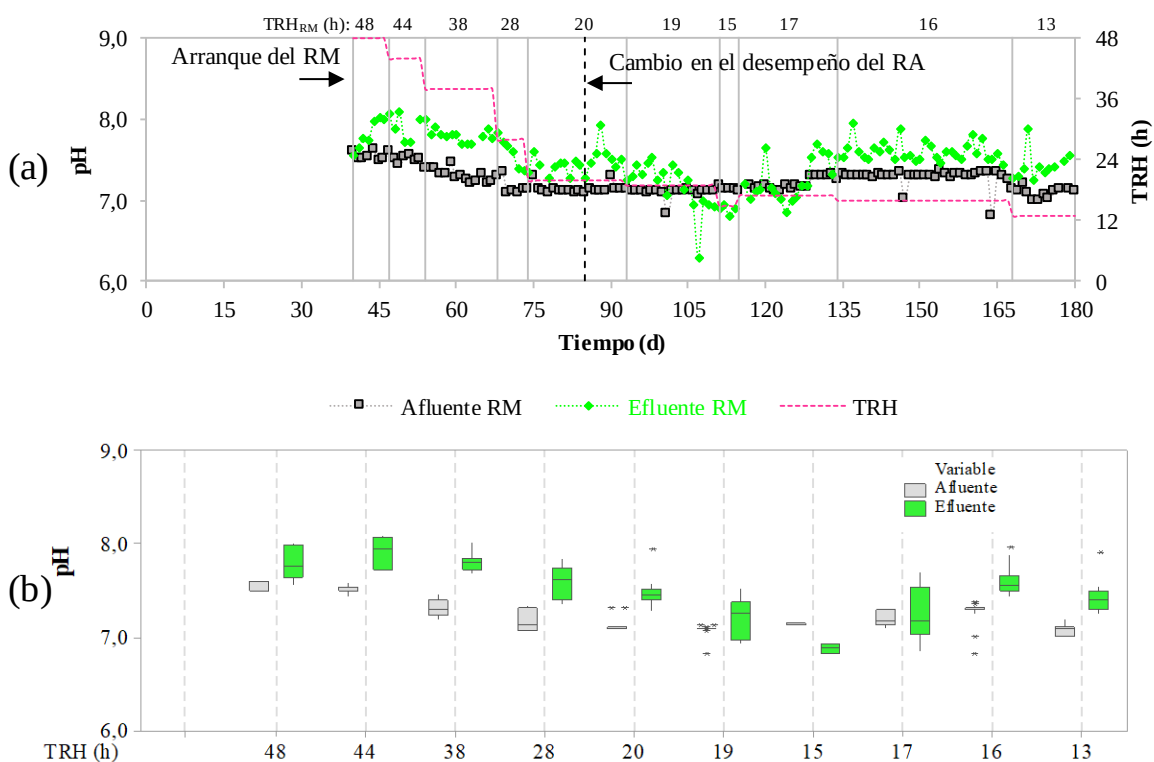


Figura 5.21 Variación del pH

Generalmente, la alcalinidad es una de las variables más importantes para evaluar la estabilidad de la DA. Las sustancias que principalmente aportan alcalinidad en la DA son el bicarbonato y AGV. Sin embargo, solo el bicarbonato es el que define la capacidad *buffer* o de amortiguación del sistema. Por lo tanto, es la concentración de la AB la que neutraliza los AGV y regula el pH. En el RM se observó que la AB inició con altos valores, los cuales fueron descendiendo gradualmente con la disminución del TRH de 48 h hasta 19 h (Figura 5.22). Ese comportamiento fue consecuencia de la disminución en la adición de bicarbonato de sodio, el cual fue adicionado teniendo en cuenta el comportamiento de índice *buffer* y el índice AI/AP. La variación de estos índices hasta el TRH referido, indicó que el sistema contenía suficiente capacidad *buffer* para neutralizar los AGV y que no había riesgo de acumulación de estos.

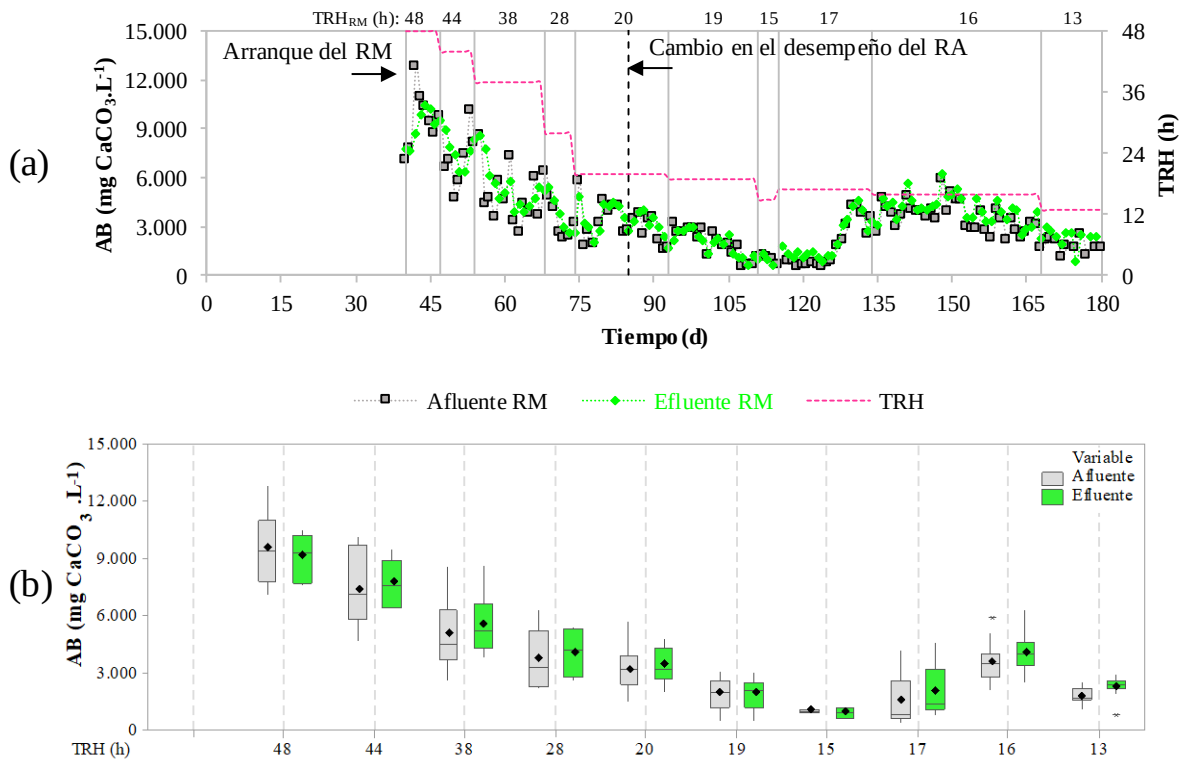


Figura 5.22 Variación de la AB

A partir del día 99, cuando se estaba evaluando el TRH de 19, se observó un incremento gradual en los niveles de DQO y los AGV afluentes al RM. Este comportamiento se extendió hasta el día 125, abarcando la evaluación del TRH de 15 y 17 h. Durante ese periodo (entre día 99 y 125) no fue suministrada suficiente capacidad *buffer* para neutralizar el exceso de AGV, por lo que el reactor se desestabilizó. A partir del día 125, se incrementó la adición del bicarbonato de sodio, con lo cual se equilibraron las relaciones entre AB y AGV, y se evitó la acidificación del RM. Esta estrategia operacional coincidió con una disminución en los niveles de AGV y DQO del efluente RA, lo que ayudó a disminuir la carga orgánica que entró al RM y así, se pudo recuperar el equilibrio permitiendo avanzar con la evaluación del arranque.

Con relación a los AGV afluentes al RM estos presentaron un valor medio de 1.729 ± 639 mg A. Acético.L⁻¹. El comportamiento de los AGV, presentado a través de la Figura 5.23 (a y b) indicó que en la mayor parte del periodo evaluado la concentración de AGV efluente fue ligeramente inferior en comparación con el afluente, lo cual puede asociarse con una baja utilización en el reactor o porque en el RM hubo producción de AGV que no permitió diferenciar la transformación neta de los AGV afluentes. El arranque del RM se inició con una concentración de AGV de 1.892 ± 180 mg A. acético.L⁻¹ (Figura 5.23b), que de acuerdo con Xu *et al.* (2014), podría haber condicionado el desempeño del RM, debido a que se encuentra dentro del rango, entre 1.500 y 2.500 mg.L⁻¹, en el cual se inhibe la actividad arqueas metanogénicas acetoclásticas.

A partir del día 134, los niveles de AGV en el afluente RM disminuyeron, debido a que también hubo una disminución en la concentración de AGV afluentes al RA (Figura 5.14), así la concentración media de AGV durante el TRH de 16 h (1.420 ± 425 mg A. acético.L⁻¹) y 13 h (1.277 ± 344 mg A. acético.L⁻¹) fue inferior al rango de inhibición señalado. En ese periodo se observó una mayor utilización de ellos AGV respecto a los TRH anteriores. Probablemente, la disminución en la concentración de AGV en el afluente incentivó la actividad de arqueas metanogénicas consumidoras de acetato. Este comportamiento, podría

ratificar la tesis anterior sobre una posible inhibición de la metanogénesis acetoclástica por elevada concentración de ácido acético.

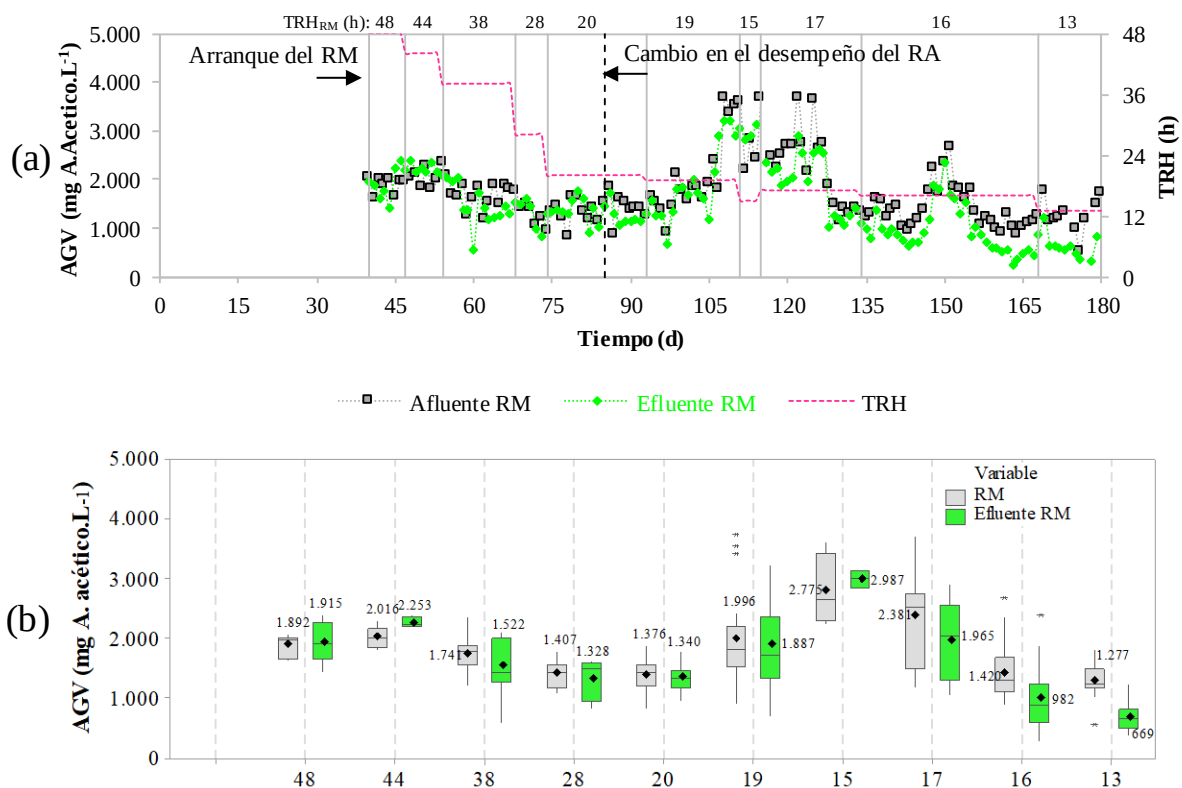


Figura 5.23 Comportamiento de los AGV. (a) Variación de los AGV afluente y efluente en todo el periodo de evaluación y (b) Variación de AGV en cada TRH

Tomando en consideración el efecto adverso que tiene la elevada concentración de AGV sobre la actividad de arqueas metanogénicas acetoclásticas y debido a que se espera que esta sea la ruta principal de producción de metano en un RM (Chavadej *et al.*, 2019), resulta necesario controlar los niveles de AGV en el afluente al RM durante el arranque de este reactor para lograr en menor tiempo un mejor establecimiento de este grupo de organismos, a pesar de que las arqueas metanogénicas acetoclásticas después de un largo periodo pueden adaptarse a un ambiente sobrecargado de acetato (Xu *et al.*, 2014). En esta investigación se observó que iniciar el arranque del RM con un TRH elevado (48 h), lo que denotaba una baja carga orgánica, no permitió el adecuado establecimiento de arqueas productoras de metano a partir del consumo de acetato, a pesar de que los índices de alcalinidad se encontraban dentro de rangos adecuados, según las recomendaciones de diversos autores (Jenkins *et al.*, 1983, Palacios-Ruiz *et al.*, 2008, Pérez y Torres, 2008, Martín-González *et al.*, 2013). Por lo anterior, es probable que durante el arranque del RM sea necesario la inclusión de la carga de AGV aplicada como una variable que permita analizar el balance de AGV dentro del reactor, debido a que a diferencia de un digestor anaerobio de una fase, en los RM que actúan como la segunda fase de la DA, resulta más difícil diferenciar entre el AGV producido y el consumido, ya que a ese balance se le debe adicionar los AGV que trae el afluente acidogénico.

Por otro lado, el comportamiento de los índices de alcalinidad presentado a través de las Figuras 5.24 a 5.26 fue usado para monitorear la acidificación del RM e identificar desequilibrios en el proceso. El índice buffer (IB) ha sido comúnmente empleado para el control de la estabilidad de la DA y una variación entre 0,20 y 0,4 ha sido aceptada como indicativo de buen funcionamiento del proceso (Speece, 1983, Rozzi, 1986). En la evaluación del arranque del RM se observó que el IB presentó preponderantemente valores inferiores a 0,20 (Figura 5.24 a y b). De acuerdo con Rozzi (1986), esos valores corresponden con un sistema

subalimentado, que en este caso fue ocasionado por la aplicación de bajas cargas orgánicas al inicio del arranque del RM, y por la disminución en la concentración de DQO al final del periodo de arranque cuando el TRH fue disminuido a 16 y 13 h. Por otro lado, se observó un fuerte incremento en el IB durante el TRH de 19 y 15 h, superando el límite máximo previamente sugerido, lo cual indicó que el sistema había sido sobrecargado y que había un riesgo de acidificación en el RM debido a que la AB era inferior al 60% respecto a la AT del sistema. En el TRH de 17 h, donde el RM mostró un mejor desempeño con relación a la reducción de carga orgánica, el IB presentó un valor medio de $0,28 \pm 0,09$, indicando que para este sistema es recomendado que el $\pm 70\%$ de la AT sea de tipo bicarbonática.

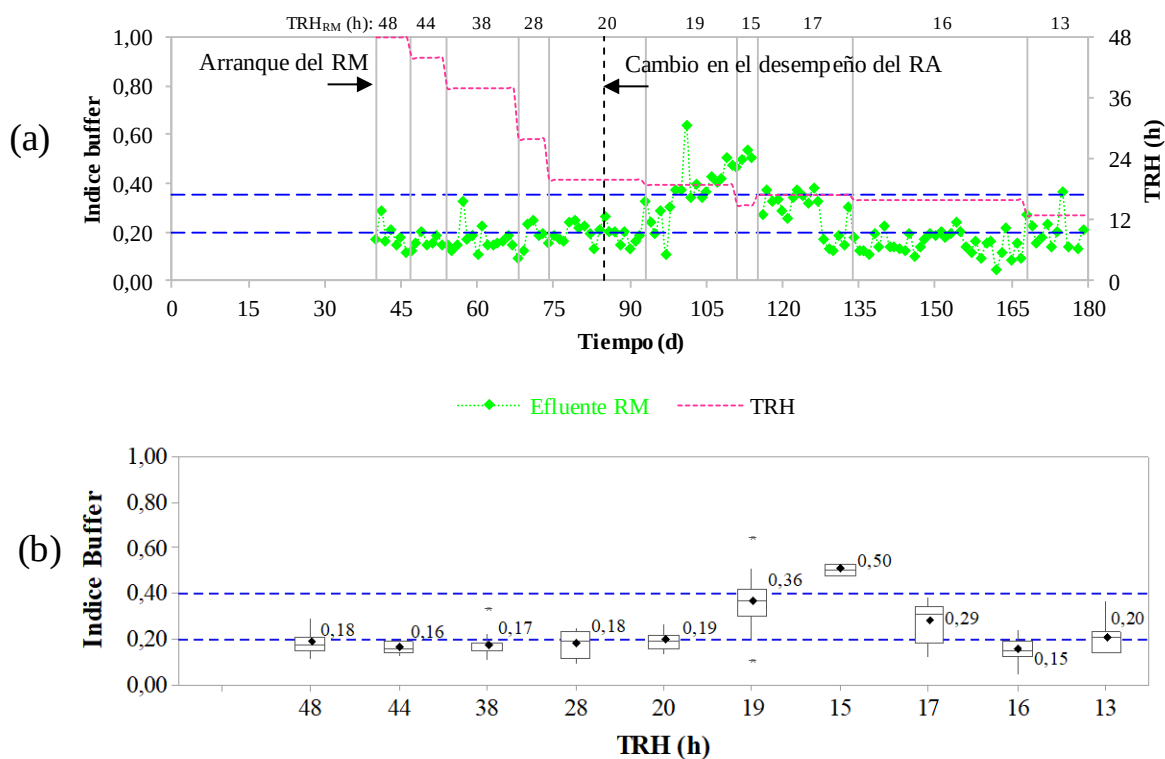


Figura 5.24 Variación del índice buffer

Respecto a la variación de la relación AI/AP presentada en el Figura 5.25, [Ripley et al. \(1986\)](#) recomiendan mantener valores inferiores a 0,3 para evitar procesos de inestabilidad. Sin embargo, los reactores anaerobios pueden encontrar su estabilidad a diferentes valores de esta relación. En general, durante todo el arranque del RM solo fueron observados procesos de inestabilidad cuando este índice presentó valores superiores a 0,50. Por ejemplo, en el día 99 durante la evaluación del TRH de 19 h el índice AI/AP se incrementó de 0,44 a 0,60 en un lapso de 24 h cuando los AGV alcanzaron un valor de 2.118 mg A. Acético.L⁻¹ y la AB fue 2.255 mg CaCO₃.L⁻¹, indicando que alrededor de estos valores eran los límites máximos para garantizar la estabilidad en el RM. En su evaluación sobre la importancia del pH y la alcalinidad en el tratamiento anaerobio del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, [Torres et al. \(2005a\)](#) reportaron que se evitó la acumulación de AGV en el reactor cuando el índice AI/AP se mantuvo alrededor de 0,5, lo cual concuerda con lo observado en este estudio. Sin embargo, considerando la fuerte variación que presenta la concentración de AGV en el efluente RA, sería más recomendable adoptar un índice AI/AP en torno de 0,40, para suministrar un contenido de AB que permita neutralizar los AGV, los cuales variaron en un amplio rango entre 551 y 3.714 mg A.acético.L⁻¹. Y de esa manera dotar al RM de suficiente de AB pero evitando la sobredosificación del alcalinizante, que pudo presentarse cuando el índice AI/AP se situó en valores bajos entorno de 0,20. Una recomendación similar fue realizada por [Martín-](#)

González *et al.* (2013) quienes establecieron un límite máximo de 0,4 de la relación AI/AP cuando los AGV presentan valores entre 3.000 y 4.000 mg A.acético.L⁻¹.

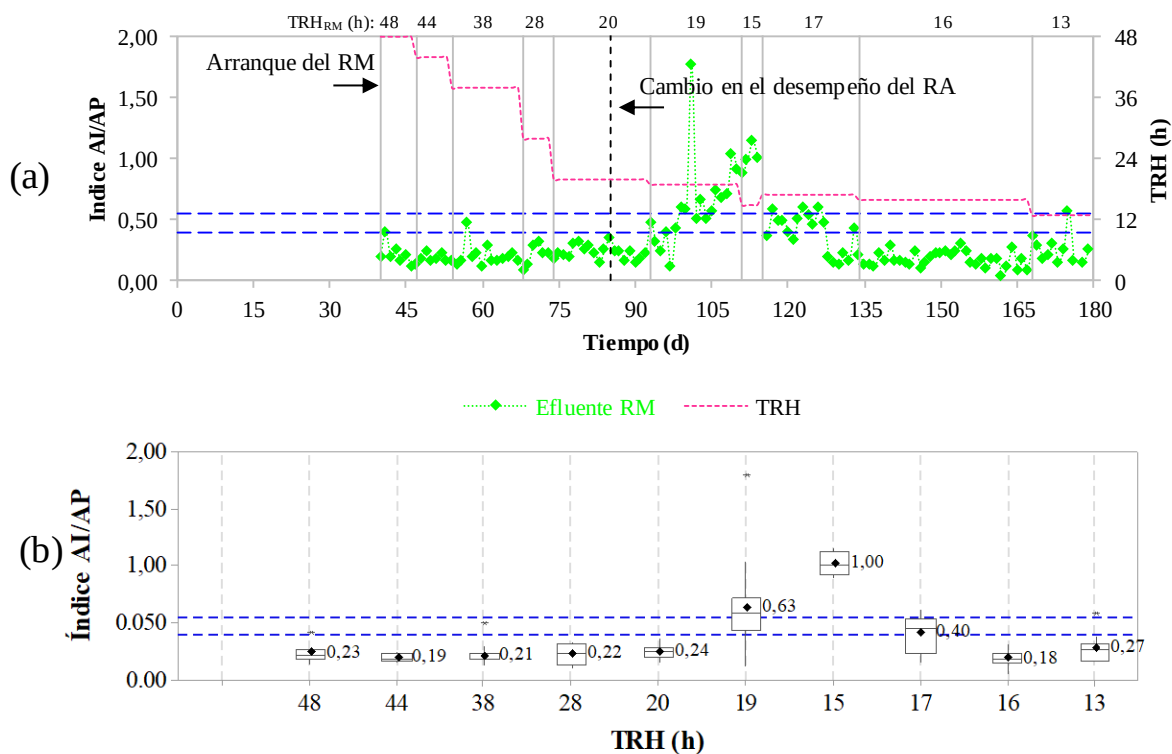


Figura 5.25 Variación del índice AI/AP

Con relación a la variación del índice α , que relaciona la AB con la AT, presentado en la Figura 5.26, se observa que la mayor parte del periodo de evaluación presentó valores en torno a 0,80 indicando que el sistema estaba dotado de una buena capacidad *buffer*, y los cuales fueron superiores al rango mínimo aceptable, entre 0,50 y 0,70, sugerido por Pérez y Torres (2008) para agua residual fácilmente acidificable. Durante el TRH de 19 y 15 h se observó que el índice α empezó a descender, incluso tomando valores inferiores al rango mínimo sugerido, indicando que la evolución adecuada del arranque del RM había sido interrumpida por una sobre carga orgánica y que había una deficiencia en la AB y posiblemente acumulación de AGV en ese periodo.

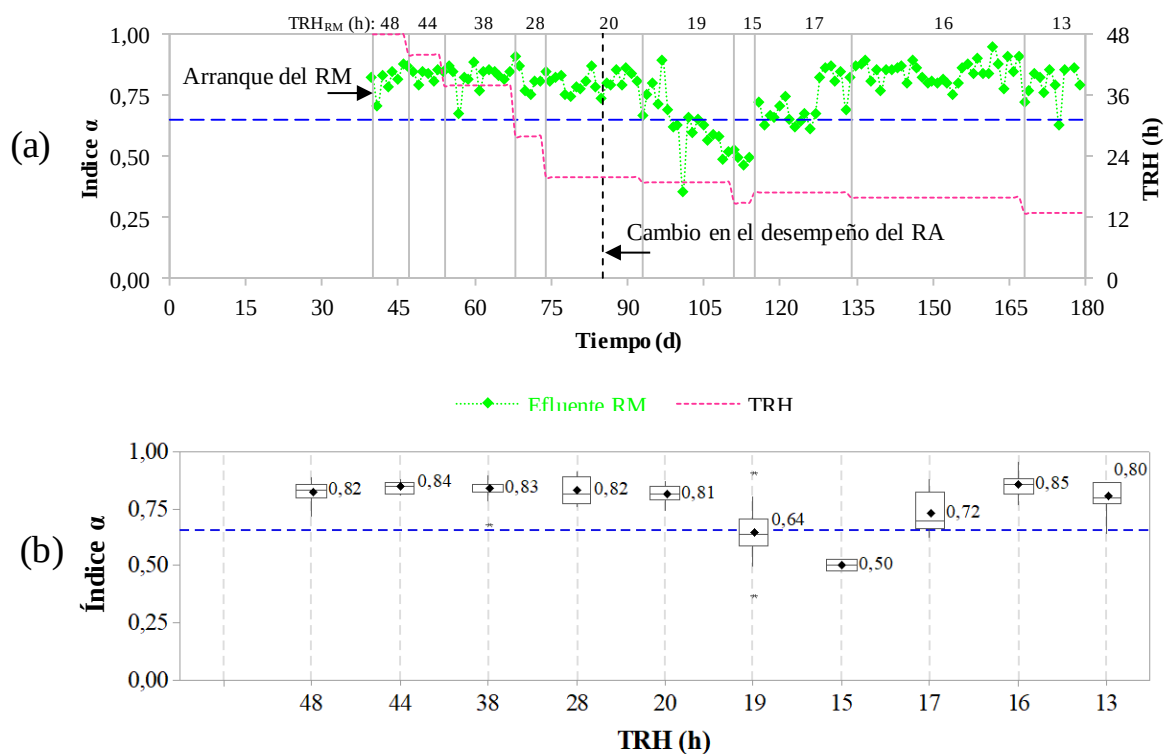


Figura 5.26 Variación del Índice α

La variación de la DQO, así como la carga orgánica y su reducción se presentan en la Figura 5.27. La variación de la DQO afluente al RM fue causada por el desempeño del RA, tomando valores en un amplio rango entre 1.242 y 13.304 mg.L⁻¹. Esa variación que caracteriza a los efluentes de procesos de fermentación se reflejó en el desempeño del RM. La DQO efluente presentó un rango de variación entre 185 y 6.954 mg.L⁻¹ y fue siempre menor con relación al afluente, indicando que una fracción de la materia orgánica era removida o retenida en el RM (Figura 5.27c).

Por su parte, la variación de la carga de DQO afluente, efluente y removida presentada en la Figura 5.27 b y c, muestra que iniciar el arranque del RM con un TRH de 48 h resultó en una carga orgánica baja de $41,4 \pm 1,9$ g DQO.d⁻¹ que fue gradualmente incrementada hasta $61,2 \pm 15,8$ g DQO.d⁻¹, a medida que se disminuyó el TRH desde 48 h hasta 20 h. Durante ese periodo fueron observados incrementos graduales en la reducción de carga orgánica, desde 41,6 hasta 58,3 %. Este comportamiento indicaba la adaptación de los microorganismos metanogénicos tanto al sustrato como a las condiciones ambientales (pH, nutrientes, temperatura, etc) y al crecimiento de biomasa metanogénica. El cambio en el desempeño del RA, tuvo lugar hacia el día 85 cuando en el RM estaba finalizando la evaluación del TRH de 20 h. En ese momento, los valores de DQO en el afluente RM no revelaron el cambio en el desempeño del RA, por el contrario, se observó un incremento gradual en la DQO afluente al RM en los días siguientes que correspondieron con el TRH de 19 y 15 h. Por lo que la carga orgánica fue fuertemente influenciada, más por el incremento en los valores de DQO que por la disminución del TRH.

La carga orgánica más alta aplicada al RM fue $195,5 \pm 34,5$ g DQO.d⁻¹ durante el TRH de 15 h. Esa sobrecarga orgánica, representó un incremento del 100% respecto a la carga orgánica anterior ($95,1 \pm 23,9$ g DQO.d⁻¹, TRH de 19 h), lo que afectó el desempeño del RM, expresado a través de una disminución en la reducción de carga orgánica (42,3%). Dos aspectos convergieron durante ese periodo para desestabilizar el desempeño del RM: (i) la concentración de AGV afluente RM se incrementó paralelo con la DQO y (ii) no se suministró suficiente capacidad buffer para neutralizar los AGV. Aunque el RA estaba mostrando en su

fase gaseosa producción de metano, en la fase líquida la reducción de DQO no correspondía con el desarrollo de una digestión anaerobia de una fase, debido a que los valores de reducción de DQO seguían siendo bajos ($21 \pm 13,4$ %, Tabla 5.6), comparables con los procesos de fermentación oscura (acidogénesis). Siendo esta la causa probable junto con el incremento en el DQO afluente al RA, los que causaron el incremento en la carga orgánica afluente al RM, durante el TRH de 19 y 15 h. Estos disturbios: sobre carga orgánica y deficiencia en la capacidad *buffer* fueron expresados a través de una notable alteración en los índices de alcalinidad, los cuales habían presentado una relativa estabilidad en sus valores (Figuras 5.24 a 5.26).

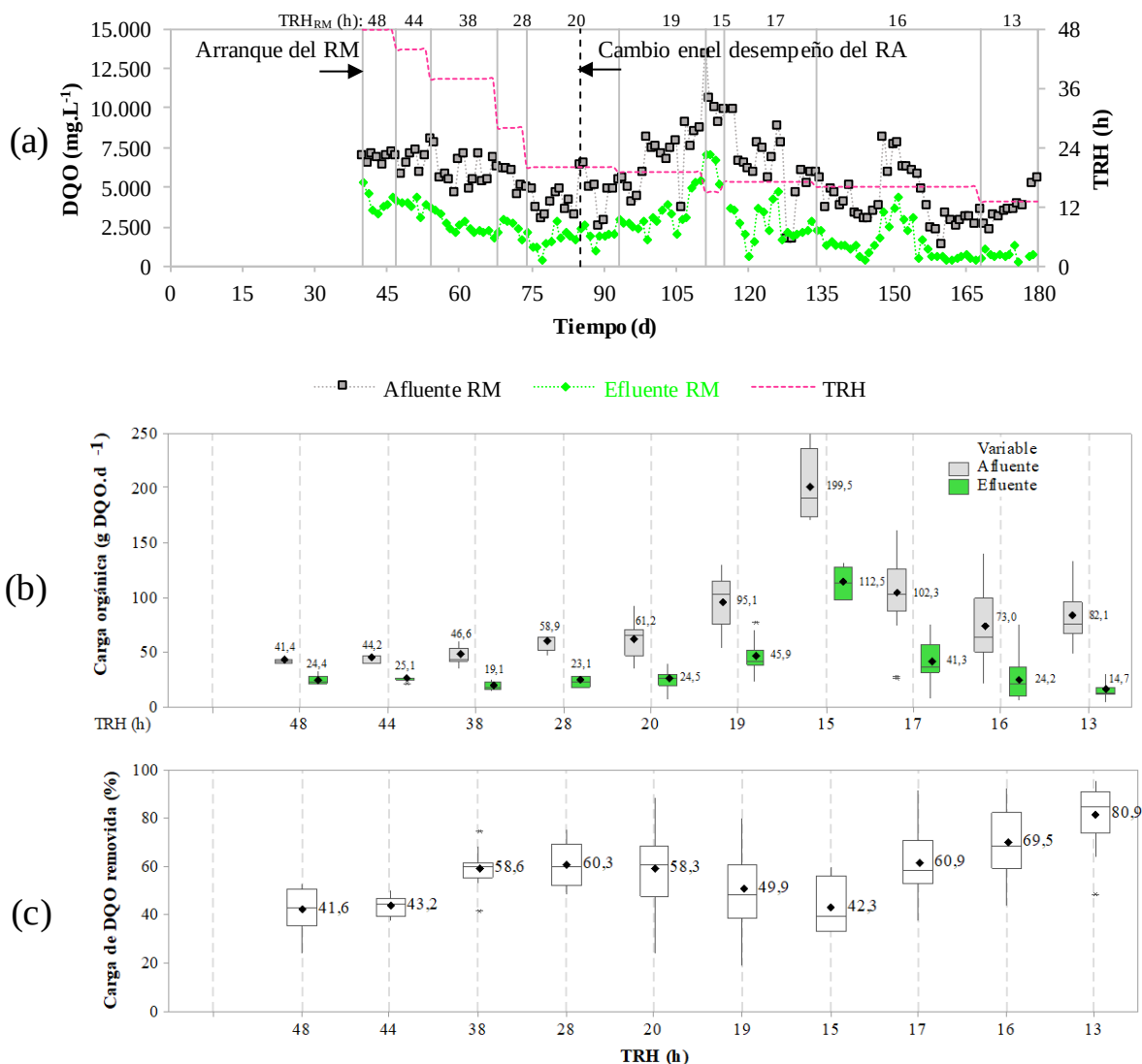


Figura 5.27 Variación de la carga orgánica. (a) Comportamiento de la DQO afluente y efluente, (b) Carga de DQO en cada TRH y (c) Reducción de carga de DQO en cada TRH

El aumento del TRH de 15 a 17 h permitió disminuir la carga orgánica después de que la DQO afluente se elevó hasta un valor de 13.304 mg.L^{-1} durante el TRH de 15 h. Así, en el TRH de 17 h la carga orgánica media presentó un valor $102,3 \pm 36,7 \text{ g DQO.d}^{-1}$ equivalente a una COV de $9,0 \pm 3,2 \text{ g DQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Con esta carga orgánica, el RM recuperó su eficiencia de reducción de carga orgánica hasta un valor de 60.9%, que se incrementó a 69,5 y 80,9% cuando el TRH fue disminuido a 16 y 13 h, respectivamente. Durante este periodo, el 60% de la materia orgánica (DQO) afluente al RM estaba representada por AGV (Figura 5.28), lo que pudo incentivar la actividad de arqueas metanogénicas consumidoras de acetato, y de esa manera, reducir la carga orgánica. Otro aspecto que pudo tener influencia sobre el desempeño del RM

en este periodo, los valores de DQO en el afluente RM presentaron una concentración media de $4.682 \pm 1.944 \text{ mg. L}^{-1}$, por lo que la disminución del TRH no tuvo un efecto notable sobre la carga orgánica aplicada.

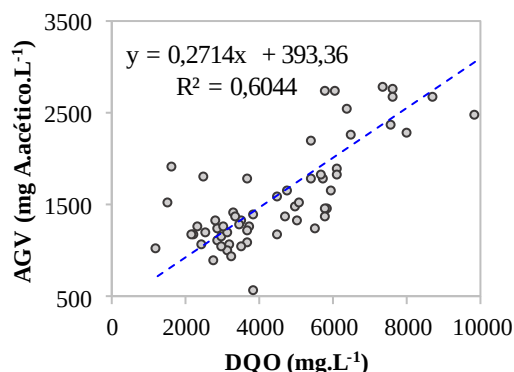


Figura 5.28 Correlación lineal entre DQO y AGV en el afluente RM en los TRH de 17, 16 y 13 h

De manera preliminar, se puede inferir que a través del arranque del RM se logró el crecimiento y establecimiento de una biomasa capaz de reconocer el sustrato, debido a que la reducción de carga orgánica, aun con las variaciones en la concentración de DQO afluente, presentó un comportamiento ascendente a medida que avanzó el periodo de evaluación. Además, fue posible restaurar el equilibrio del sistema frente a una sobre carga orgánica. También, se pudo establecer que la carga orgánica máxima aplicada que pudo tolerar el RM estaba alrededor de 100 g DQO.d^{-1} , equivalente a una COV de $9,0 \pm 3,2 \text{ g DQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ con un TRH de 17 h. Sin embargo, la selección de estos valores como la mejor condición operacional del RM, dependerá ampliamente de la concentración de DQO en el efluente del RA, debido a que concentraciones de DQO superiores a 8.000 mg.L^{-1} afectaron el desempeño del RM.

El desempeño del RM respecto a la variación de la carga de SST aplicada, efluente y removida se presenta en la Figura 5.29 (a, b y c). Se puede observar una tendencia creciente en la reducción de carga de SST a medida que avanzó el arranque del RM. Solo en la evaluación del TRH de 19 se observó una reducción en el porcentaje de eliminación de carga de SST respecto al TRH inmediatamente anterior. Este comportamiento, se atribuye a un arrastre o acumulación de sólidos en la zona de salida del reactor que pudieron alterar la calidad del efluente, más que a una sobre carga de sólidos, debido a que la carga de SST aplicada en ese periodo fue una de las más bajas ($2,39 \text{ g SST.d}^{-1}$). Probablemente, hacia ese momento ocurrió algún desprendimiento de la biopelícula que fue arrastrada con el flujo horizontal y generó la alteración en la calidad del efluente.

Un aspecto interesante que se observó, es que el incremento de carga de SST que se presentó también durante el TRH de 15 h, no tuvo un fuerte impacto sobre el desempeño del RM, debido a que la carga eliminada de SST se mantuvo en un nivel superior al 50%. Este comportamiento, es atribuido a la fuerte retención de sólidos que ocurre en reactores de medio fijo, en los cuales la biomasa suspendida en los espacios vacíos, retiene las partículas por un efecto de adherencia. Esta biomasa representa la mayor parte de la biomasa total, y según [Ganesh et al. \(2010\)](#) contribuye considerablemente a la actividad biológica, más que la formación de biopelícula.

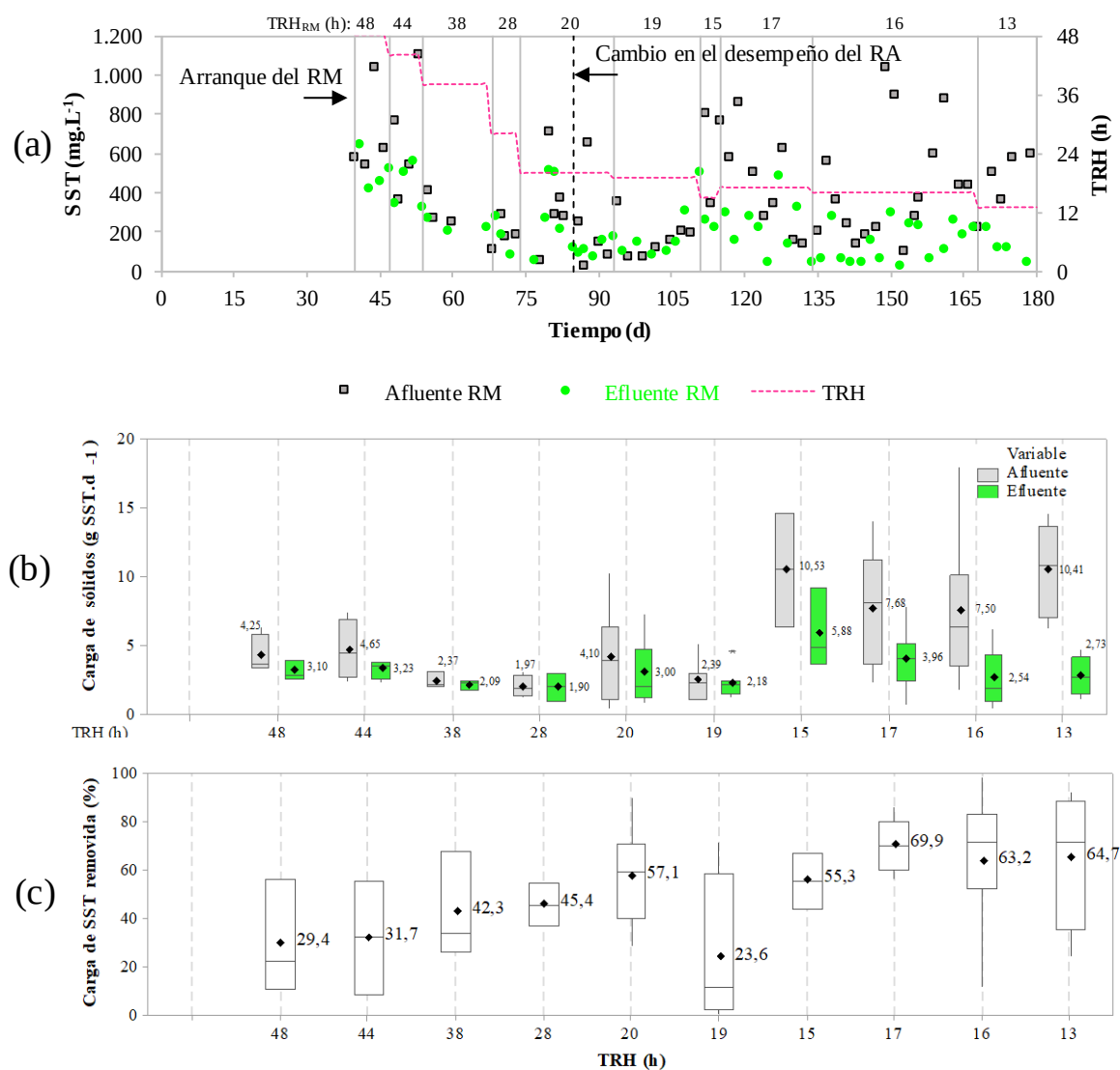


Figura 5.29 Variación de la carga de sólidos. (a) comportamiento de los SST afluente y efluente, (b) Carga de SST aplicada en cada TRH y (c) Reducción de carga de SST en cada TRH

En la Figura 5.30 se presenta la biomasa formada sobre el medio de soporte (izquierdo) y la biomasa suspendida (derecha), en ella se observa que cualitativamente fue mayor la biomasa suspendida. Adicionalmente, la reducción de carga de SST también puede ser atribuida al flujo mixto del RM, debido a que las partículas sólidas son incapaces de seguir el flujo del líquido (ascendente y descendente), y por lo tanto, quedan retenidas en el reactor.

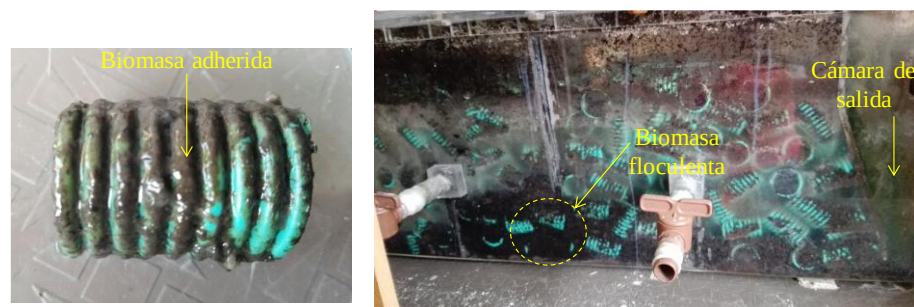


Figura 5.30 Biomasa adherida (izquierda) e intersticial (derecha)

Aún con la fuerte variación en la carga de sólidos aplicada, la máxima reducción de carga de SST (69,9%) fue observada con el TRH de 17 h (Figura 5.29c). Este nivel de eficiencia pudo disminuir debido al desprendimiento y acumulación de la biopelícula que sufren los reactores de medio adherido. Sin embargo, [Escudié et al. \(2011\)](#) informan que una baja producción de gas durante el arranque de reactores anaerobios de medio adherido ayuda a regular las fuerzas hidrodinámicas y controla las tasas de crecimiento y desprendimiento de la biopelícula, lo cual permite una acumulación más rápida de biomasa sobre el medio de soporte, y posibilita mayores capacidades de conversión volumétrica que carga contaminante sin perder rápidamente la eficiencia del RM en cuanto la reducción de sólidos.

5.2.2.3 Monitoreo de la producción de biogás y CH₄ en el RM

La producción volumétrica de biogás (PVB), composición del biogás y MY fueron usados como indicadores de la evolución del arranque del RM. La Figura 5.31a muestra que la PVB se incrementó gradualmente con la disminución del TRH, desde 48 h hasta 17 h, donde presentó un valor máximo. Después, describió un comportamiento descendiente que se extendió hasta el día 159, cuando se estaba evaluando el TRH de 16 h. Luego, se aprecia una recuperación en la PVB en el último TRH evaluado (13 h). La curva de PVB de biogás describió el comportamiento esperado de un proceso de arranque de un reactor anaerobio y parece no estar alterada por el cambio en desempeño del RA. La fluctuación en la tendencia creciente obedece a la variación en la composición del agua residual, es decir a la variación en la carga orgánica aplicada. En procesos de arranque de reactores anaerobios en los cuales la carga orgánica aplicada es controlada a través del incremento de la DQO, las fluctuaciones en la curva de producción de biogás son más acentuadas ([Meng et al., 2017](#)).

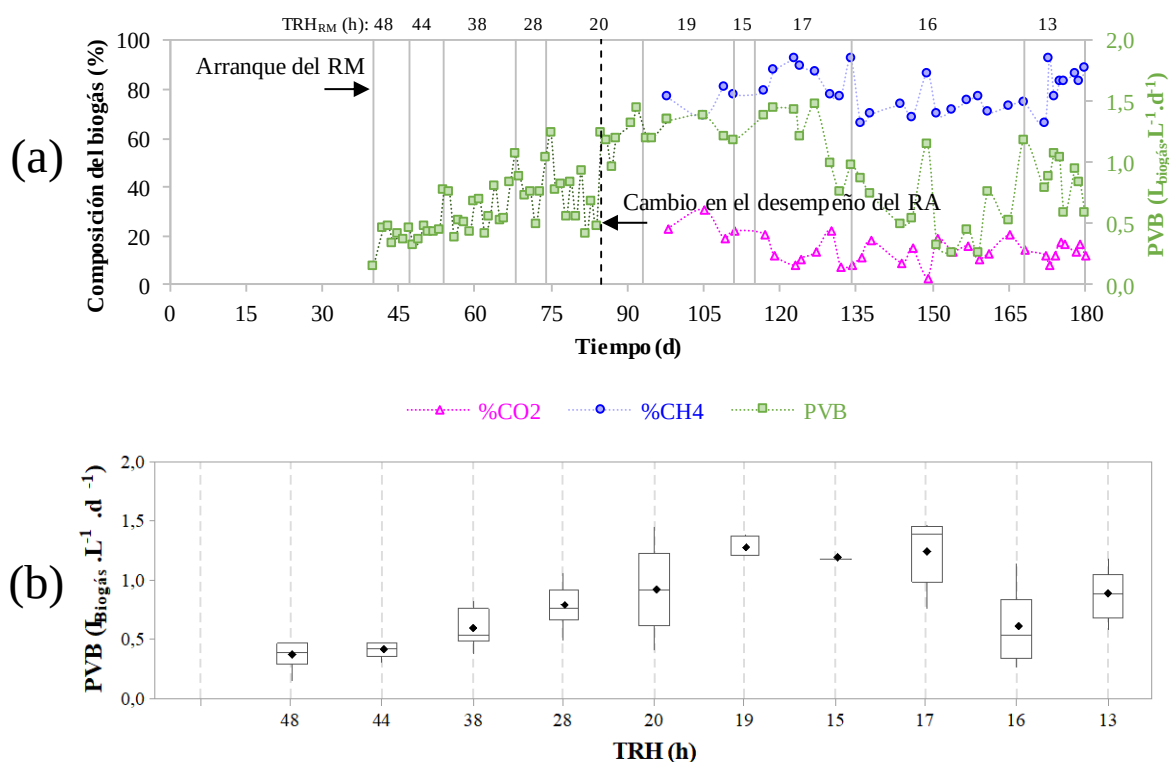


Figura 5.31 Indicadores del desempeño del RM. (a) Composición del biogás y (b) Producción volumétrica de biogás (PVB)

En reactores metanogénicos la producción de metano hace parte del metabolismo energético de arqueas metanogénicas acetoclásticas del género *Methanosarcina* y *Methanosaeta*. Las primeras, tienen mayor afinidad por el acetato, pero crecen más lentamente que las segundas. Mientras que la *Methanosarcina* que consume tanto acetato como H_2/CO_2 , comúnmente domina en ambientes con altas concentraciones de sales (Carrillo-Reyes *et al.*, 2014). El comportamiento de la curva de PVB, descrito en el párrafo anterior, podría estar relacionado con las diferencias entre las dos familias de metanógenos acetoclásticos comúnmente encontrados en reactores metanogénicos. Al inicio, el afluente RM presentó altas concentraciones de sales, por lo que es probable que predominaran metanógenos del género *Methanosarcina* y con ello un menor consumo de acetato, expresado través de una baja transformación de los AGV (Figura 5.23) y baja PVB. Luego, probablemente la reducción en el nivel de sales en el afluente RM favoreció la proliferación de arqueas del género *Methanosaeta* y con ello una mejor PVB y consumo de acetato. Así, hacia el día 127 con un TRH de 17 h cuando el nivel de sales en el afluente RM fue muy bajo, el RM encontró la máxima PVB ($1,47 L_{biogas} \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$), que podría asociarse con un dominio de arqueas del género *Methanosaeta*. Esta hipótesis sobre la alternancia entre los dos géneros de metanógenos acetoclásticos en función del contenido de sales se ajusta a la disminución y posterior incremento de la PVB observada en el TRH de 16 y 13 h, respectivamente. También la alternancia entre los dos grupos de metanógenos señalados ha sido asociada con la disminución gradual del TRH. Así, Schmidt *et al.* (2014) explican que a altos TRH se estimula el crecimiento de *Methanosarcina* y a medida que se disminuye el TRH la población de arqueas del género *Methanosaeta* se incrementa debido a que tienen una mejor capacidad para la formación de biopelícula.

Se observó una notable diferencia entre la máxima PVB obtenida en este estudio con la reportada por Colin *et al.* (2007), la cual fue $3,7 L_{biogas} \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ obtenida un reactor anaerobio de características semejantes alimentado con un sustrato de procedencia similar y operado como un reactor anaerobio de una fase con un TRH de 9,5 h. Adicionalmente a los aspectos relacionados con la actividad microbiana

previamente presentados, la baja PVB registrada en el RM podría deberse a problemas hidrodinámicos en el reactor. Aunque la producción de biogás fue observada a los pocos días que se inició el arranque del RM, con el crecimiento de la biomasa también se observó que pequeñas burbujas de biogás quedaban atrapadas entre el medio de adherencia y la biomasa suspendida, tal como se ilustra en la Figura 5.32. Lo cual podría haber interferido con la liberación y captación del biogás, y por lo tanto, con su cuantificación. Probablemente, un ordenamiento del medio de soporte como el utilizado por [Anzola-Rojas et al. \(2015\)](#) o la selección de un medio de soporte con mayor porcentaje de área superficial efectiva que reduzca la acumulación de biomasa suspendida podría contribuir con la liberación del biogás desde la fase líquida hacia el *headspace* y de esta manera, mejorar el registro de la producción de biogás. También, deficiencias en la captación del biogás podrían ser responsables de la baja productividad de biogás registrada. La forma del reactor impedía una buena captación del biogás debido a que toda la zona superficial que cubría el medio de soporte se constituyó en un gran *headspace*, y solo al alcanzar su presurización se logró la contabilización del biogás. Para resolver la presurización del reactor, se podría individualizar completamente, en la parte superior del RM, cada una de las cámaras que lo conforman y de esta manera se tendrían pequeños *headspace* que serían más sencillos de presurizar.

La determinación de la composición del biogás sólo pudo realizarse a partir del día 98 bajo el TRH de 19 h, cuando el RM ya llevaba 48 días de operación. El biogás generado contenía principalmente CH_4 (66% - 98%) y CO_2 (3% - 31%). La composición fue similar a lo reportado por [Lullio et al. \(2014y\)](#), [España-Gamboa et al. \(2018\)](#) en sistemas anaerobios operados en dos fases. Teniendo en cuenta que la metanogénesis acetoclástica e hidrogenotrófica son las dos principales vías de formación de metano en la DA ([Dinamarca et al., 2011](#), [Abbasi et al., 2012](#)) y que en el afluente al RM, probablemente no existían los sustratos necesarios para la metanogénesis hidrogenotrófica (H_2 y CO_2), el metano producido puede ser atribuido principalmente al establecimiento de arqueas productoras de metano a partir del consumo del ácido acético. Esta suposición puede encontrar sus fundamentos en que el hidrógeno producido en el RA fue captado en ese reactor y que en el RM no hubo un incremento en la concentración de AGV que conjuntamente llevara a la producción de hidrógeno. [Volpini et al. \(2018\)](#) reportaron la producción de metano predominantemente a través de la vía acetoclástica, en un reactor metanogénico operado en modo discontinuo y que trataba el efluente de la producción de biohidrógeno a partir de vinaza de caña de azúcar. También en la investigación de [Almeida et al. \(2017\)](#) el metano fue predominantemente producido por el consumo de ácido acético.

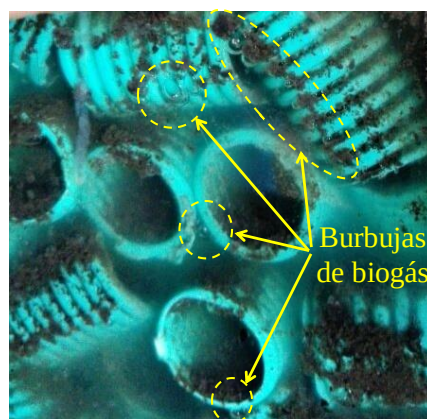


Figura 5.32 Burbujas de biogás atrapadas em el medio de soporte

El MY también presentó una alta variabilidad, en un rango entre 41 y 274 $\text{mL CH}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ DQO removida (Figura 5.33). El máximo MY fue observado en el TRH de 19 h, ese valor (274 $\text{mL CH}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ DQO removida) aunque es comparable con los reportados por diversos estudios presentados en la Tabla 5.8, difiere del valor teórico de 350 $\text{mL CH}_4 \cdot \text{g}^{-1}$ DQO removida, que corresponde con el establecimiento de un ecosistema metanogénico estable ([Michaud et al., 2002](#)). Tanto el BY como el MY en cada uno de los TRH evaluados

alcanzaron un valor máximo y luego descendieron. Probablemente ese comportamiento describe dos de las tres fases de formación de la biopelícula que son: (i) inducción que se caracteriza por la disminución del MY como consecuencia del lavado del inóculo) y (ii) crecimiento que se relaciona con el aumento del MY (Escudié *et al.*, 2011).

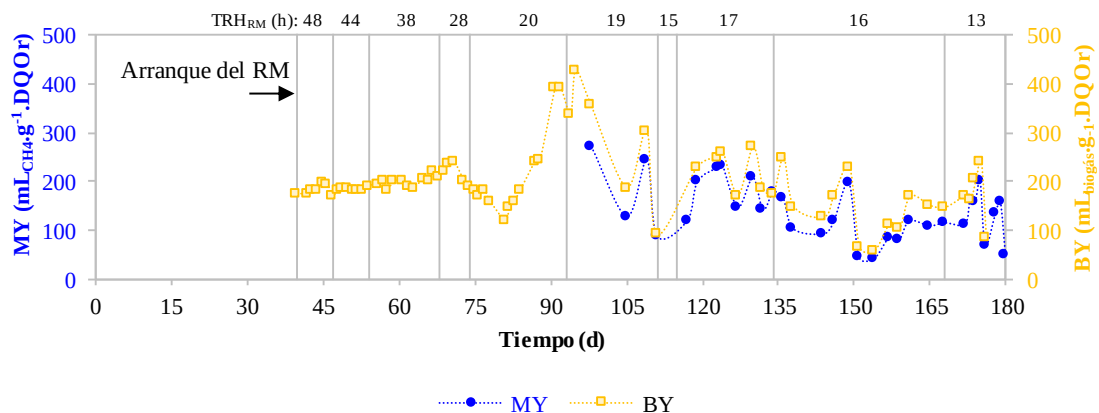


Figura 5.33 Rendimiento de metano (MY) y rendimiento de biogás (BY)

De acuerdo con Michaud *et al.* (2005), en el arranque de reactores anaerobios los bajos MY indican que la actividad anabólica es mayor que la catabólica, debido a que los microorganismos se encuentran en la fase de construcción de la biopelícula y que a medida que avanza el periodo de arranque, el MY se va incrementando hasta alcanzar un nivel estable que corresponde con el final de formación de la biopelícula. De esta manera, se podría inferir que en cada TRH referido, los microorganismos metanogénicos desarrollaron una biopelícula adherida al medio de soporte y que la variación de las condiciones operacionales, ofrecidas tanto por la variación en la composición del sustrato como la disminución del TRH, generaron un entorno inestable, por lo que no fue posible observar un equilibrio entre el crecimiento de la biopelícula y el desprendimiento de biomasa, que se tradujera en un MY estable. Por lo anterior, se puede concluir parcialmente que la variación tanto del BY como MY es reflejo del desarrollo de la biopelícula y ratifica el uso del MY como un indicador para el monitoreo del proceso de arranque de reactores anaerobios de crecimiento adherido y que, además, en este caso particular indicó que el RM se mantuvo en un proceso de arranque sin establecer una operación en estado estable.

Tabla 5.8 Rendimiento de metano en procesos de DA en dos fases

Tipo de Reactor	Sustrato	Composición del biogás	MY (mL CH ₄ .g ⁻¹ DQO removida)	Autor
UASB híbrido	<i>Manipueira</i>	80 % CH ₄	280	Paixão <i>et al.</i> (2000)
CSTR	Residuos de yuca	-	249 mL CH ₄ .g ⁻¹ SV	Luo <i>et al.</i> (2010)
UASB	AR del procesamiento de yuca	68 % CH ₄	183 mL CH ₄ .g ⁻¹ DQO removida	Intanoo <i>et al.</i> (2014)
Reactor de crecimiento adherido	Vinazas de la producción de tequila	70 a 75 % CH ₄	320 – 340	(Hmissi <i>et al.</i> , 2017)
UASB	AR del procesamiento del maíz	84 % CH ₄	282	España-Gamboa <i>et al.</i> (2018)
Reactor de crecimiento adherido	AR del proceso de extracción de almidón de yuca	66 - 98% CH ₄	41 - 273	En este estudio

5.2.3 Selección de la condición de operación del RM para el acople con el RA

A partir de los resultados observados del monitoreo del arranque del RM entre el día de operación 40 y 85 se seleccionó la condición de operación más apropiada para el acople de los dos reactores. Este periodo se seleccionó en virtud del desempeño del RA, debido a que a partir del día 85 ese reactor perdió su condición de reactor hidrogenador o productor de hidrógeno. En la Tabla 5.9 se presenta un resumen del BY del RA y RM durante el periodo mencionado. Un análisis de varianza permitió establecer que existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores medios del BY en el RM en función del TRH. Así, el mayor BY en el RM fue observado cuando el reactor fue operado con un TRH de 28 h. De esta manera, se establece una condición inicial para el acople entre el RA y RM para la evaluación de la producción conjunta de H_2 y CH_4 a partir de la DA en dos fases del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca.

Tabla 5.9 Resumen del BY en el RA y RM

Rendimiento de biogás (BY)	TRH _{RM} (h)	N	Media	Desv.Est.	Mínimo	Máximo
RA (mL biogás.g CH removidos)	-	32	76	60	2	208
RM (mL biogás.g DQO removida)	48	6	184	10	173	198
	44	7	181	5	170	185
	38	11	197	11	182	220
	28	5	221	17	200	240
	20	9	165	22	120	190

En la Tabla 5.10 se presentan las condiciones operacionales del RA y RM durante el periodo en cual el RM se operó con un TRH de 28h. De acuerdo con los resultados discutidos en los ítems anteriores, esas condiciones operacionales representan una condición inicial para evaluar la producción conjunta de H_2 y CH_4 a partir de la DA en dos fases del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, empleando un RA de crecimiento auto-inmovilizado con control sobre la COVe y un RM de crecimiento adherido y flujo mixto.

Tabla 5.10 Condiciones iniciales de operación y control para el acople entre el RA y RM

Reactor	Variable	Unidades	N	Media	Desv.Est.	Mínimo	Máximo
RA	COV	g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹	6	16,8	4,1	10,4	21,2
		g CH.L ⁻¹ .d ⁻¹	6	5,0	0,8	3,6	5,8
	COVe	g CH.g ⁻¹ SV.d ⁻¹	1	0,8	*	0,8	0,8
	TRH	h	6	8,0	0,1	7,9	8,2
	pH	-	6	5,3	0,1	5,2	5,5
RM	COV	g DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹	6	4,8	0,6	3,9	5,3
	TRH	h	6	28	0,0	28	28
	pH	-	6	7,2	0,1	7,1	7,3
	NaHCO ₃ /DQO	-	6	1:1,1	0,4	0,8	1,7
	Índice IB	-	6	0,2	0,1	0,1	0,2
	Índice AI/AP	-	6	0,2	0,1	0,1	0,3
	Índice α	-	6	0,8	0,1	0,8	0,9

N: número de datos

A partir de la condición inicial de operación para el acople entre los dos reactores (RA y RM) deberán realizarse estudios adicionales para mejorar el HY y MY, debido a que los resultados indicaron que los valores medios de HY y MY difieren de los máximos teóricos, $4,0 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ CH}$ y $350 \text{ mL CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQOr}$, respectivamente. No obstante, el resultado indica que es factible la producción conjunta de hidrógeno y metano a partir de la digestión anaerobia del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. El MY obtenido durante el arranque del RM es susceptible de incrementarse, debido a que un porcentaje importante de AGV que son el sustrato principal para las arqueas metanogénicas acetoclásticas, no fue totalmente transformado en ese reactor. Los posibles factores que causaron este comportamiento ya han sido presentados y discutidos en ítem anteriores. Debido a que no se trata de limitaciones de orden metabólico, sino de posible inhibición por condiciones ambientales adversas o deficiencias nutricionales, se puede suponer que al mejorar esas condiciones también se incremente la metanogénesis acetoclástica y con ello el MY y la calidad del efluente del RM.

5.3 CONCLUSIONES PARCIALES DEL CAPÍTULO 5

Con relación al RA, la disminución del TRH a 8 h incrementó la formación de gránulos productores de hidrógeno. La operación durante 180 d mostró que las arqueas metanogénicas fueron capaces de recobrar su actividad metabólica después de un largo periodo de adaptación, aun bajo condiciones ambientales adversas (pH inferiores 6.0). Por lo tanto, se han de implementar métodos complementarios al pretratamiento del inóculo para evitar su recrecimiento.

También el estudio mostró que a medida que avanzó el periodo de arranque del RM se estableció una biomasa metanogénica capaz de remover la carga variable de DQO y AGV proveniente del RA. Aun así, se necesitan estudios complementarios para mejorar la producción de metano a partir del efluente acidogénico de un reactor alimentado con agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, debido que no controlar el contenido de AGV y DQO afluentes al RM, es decir la carga orgánica aplicada, resultó en un efecto negativo que afectó el arranque del RM.

Los índices de alcalinidad resultaron una guía importante para evidenciar condiciones de inestabilidad del reactor. Por las características del afluente al RM, una relación AI/AP inferior a 0.40 es recomendada para reducir la inhibición de las arqueas metanogénicas cuando los AGV presentan valores superiores a $1.500 \text{ mg A. acético} \cdot \text{L}^{-1}$.

En general se observó que es factible la producción conjunta de hidrógeno y metano, a partir de la DA de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, operando el RA con un COVe de 0,8 $\text{mg CH} \cdot \text{g}^{-1} \text{ SV} \cdot \text{d}^{-1}$, TRH de 8 h y pH de $5,2 \pm 0,2$, y el RM con TRH de 28 h y COV de $4,8 \text{ g DQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

5.4 RECOMENDACIONES

Con relación al RA se recomienda explorar la adición de una sustancia química que actúe complementariamente al pretratamiento del inóculo, como un inhibidor de la metanogénesis, con el propósito de evitar el recrecimiento a mediano y largo plazo de las arqueas metanogénicas. Y así, poder estudiar el comportamiento del HY a largo plazo a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca.

Para disminuir el periodo de arranque del RM se recomienda realizar el incremento de la carga orgánica en función de la concentración de DQO o AGV, para evitar que el RM sea subalimentado debido

a la variación de la composición del efluente acidogénico. Y además, porque el desempeño del RM mostró una mayor sensibilidad a la variación de la composición del efluente acidogénico que al incremento de la carga hidráulica (disminución del TRH).

Se recomienda mejorar la captación del biogás en el RM para una mejor estimación de la PVB, probablemente una separación de las cámaras que lo conforman sería una alternativa viable y sencilla que reduciría el volumen del *headspace*.

Analizar la degradación de la materia orgánica en cada uno de los compartimientos del RM, debido a que es probable que la adición de bicarbonato se reduzca entre una cámara y otra. De esa manera quizás sea necesaria una dosificación diferencia o escalonada que mejore la producción de metano. También para establecer el requerimiento mínimo de compartimientos para incrementar el tiempo de retención celular y eliminar una mayor carga de sólidos de tipo biodegradable que se relacionan con biomasa que sale del RA.

Determinar el contenido de cationes (Na^+) en el efluente del RA para poder establecer el aporte real de sales disueltas de este afluente, debido al efecto inhibitorio que tienen las sales disueltas sobre el crecimiento de las arqueas metanogénicas.

De manera general, tanto para el RA como RM es necesario complementar los estudios de otras variables que ayuden a mejorar el HY e MY. Entre ellas resulta importante analizar de manera detallada la disponibilidad de nutrientes.

5.5 REFERENCIAS DEL CAPITULO 5

- ABBASI, T.; TAUSEEF, S. M. & ABBASI, S. A. (2012). Anaerobic digestion for global warming control and energy generation—An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 3228-3242.
- ALMEIDA, W.; RATUSZNEI, S.; ZAIAT, M. & RODRIGUES, J. (2017). AnSBBR applied to biomethane production for vinasse treatment: effects of organic loading, feed strategy and temperature. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 34, 759-773.
- ANZOLA-ROJAS, M. D. P.; GONCALVES DA FONSECA, S.; CANEDO DA SILVA, C.; MAIA DE OLIVEIRA, V. & ZAIAT, M. (2015). The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. *Biotechnol Rep (Amst)*, 5, 46-54.
- APHA; AWWA & WEF (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, DC: American Public Health Association.
- APPELS, L.; BAEYENS, J.; DEGRÈVE, J. & DEWIL, R. (2008). Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 755-781.
- AROOJ, M. F.; HAN, S. K.; KIM, S. H.; KIM, D. H. & SHIN, H. S. (2008). Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 3289-3294.
- CAROSIA, M. F.; DOS REIS, C. M.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. & SILVA, E. L. (2017). Influence of C/P and C/N ratios and microbial characterization in hydrogen and ethanol production in an anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 9600-9610.
- CARRILLO-REYES, J.; CELIS, L. B.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F.; MONTOYA, L. & RAZO-FLORES, E. (2014). Strategies to cope with methanogens in hydrogen producing UASB reactors: Community dynamics. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, 11423-11432.

- CARRILLO-REYES, J.; CELIS, L. B.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F. & RAZO-FLORES, E. (2012). Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 5591-5601.
- CASTELLÓ, E.; GARCÍA Y SANTOS, C.; IGLESIAS, T.; PAOLINO, G.; WENZEL, J.; BORZACCONI, L. & ETCHEBEHERE, C. (2009). Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 5674-5682.
- CHAVADEJ, S.; WANGMOR, T.; MAITRIWONG, K.; CHAICHIRAWIWAT, P.; RANGSUNVIGIT, P. & INTANOO, P. (2019). Separate production of hydrogen and methane from cassava wastewater with added cassava residue under a thermophilic temperature in relation to digestibility. *Journal of Biotechnology*, 291, 61-71.
- CHEN, C.; LIN, C. & CHANG, J. (2001). Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 56-64.
- CHEN, Y.; CHENG, J. J. & CREAMER, K. S. (2008b). Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource technology*, 99, 4044-4064.
- CHERNICHARO, C. (1997a). Principípios do tratamento biológico de águas residuárias: Reatores anaeróbios. Vol. DESA-UFGM, Brasil. ISBN 85-7041-130-8.
- CHERNICHARO, C. (2007). *Reactores anaerobios-Principios del Tratamiento Biológico de Aguas Residuales*.
- 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. *Bioresour Technol*, 98, 1602-7.
- DILALLO, R. & ALBERTSON, O. E. (1961). Volatile acids by direct titration. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 356-365.
- DINAMARCA, C.; GANAN, M.; LIU, J. & BAKKE, R. (2011). H₂ consumption by anaerobic non-methanogenic mixed cultures. *Water Sci Technol*, 63, 1582-9.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. & SMITH, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- ESCUDIÉ, R.; CRESSON, R.; DELGENÈS, J.-P. & BERNET, N. (2011). Control of start-up and operation of anaerobic biofilm reactors: An overview of 15 years of research. *Water Research*, 45, 1-10.
- ESPAÑA-GAMBOA, E.; DOMÍNGUEZ-MALDONADO, J. A.; TAPIA-TUSSELL, R.; CHALECANUL, J. S. & ALZATE-GAVIRIA, L. (2018). Corn industrial wastewater (nejayote): a promising substrate in Mexico for methane production in a coupled system (APCR-UASB). *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 712-722.
- FANG, H. H. P.; LIU, H. & ZHANG, T. (2002). Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 78, 44-52.
- FIELD, J.; SIERRA-ALVAREZ, R. & LETTINGA, G. (1988). Ensayos anaerobios (Anaerobic assays). 4 Seminario de Depuración Anaerobia de Aguas Residuales. *Universidad de Valladolid, Spain*.
- FRANKE-WHITTLE, I. H.; WALTER, A.; EBNER, C. & INSAM, H. (2014). Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. *Waste Management*, 34, 2080-2089.
- FUESS, L. T.; MAZINE KIYUNA, L. S.; GARCIA, M. L. & ZAIAT, M. (2016). Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 8132-8145.

- GANESH, R.; RAJINIKANTH, R.; THANIKAL, J. V.; RAMANUJAM, R. A. & TORRIJOS, M. (2010). Anaerobic treatment of winery wastewater in fixed bed reactors. *Bioprocess and biosystems engineering*, 33, 619-628.
- HASAN, S. D.; GIONGO, C.; FIORESE, M. L.; GOMES, S. D.; FERRARI, T. C. & SAVOLDI, T. E. (2015). Volatile fatty acids production from anaerobic treatment of cassava waste water: effect of temperature and alkalinity. *Environ Technol*, 36, 2637-46.
- HMISSI, M.; HARMAND, J.; ALCARAZ-GONZALEZ, V. & SHAYEB, H. (2017). Evaluation of alkalinity spatial distribution in an up-flow fixed bed anaerobic digester. *Water Science and Technology*.
- INFANTES, D.; GONZÁLEZ, A.; VILLASEÑOR, J. & FERNÁNDEZ, F. (2011). Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 15595-15601.
- INTANOO, P.; CHAIMONGKOL, P. & CHAVADEJ, S. (2016). Hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactors (UASB) with an emphasis on maximum hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 6107-6114.
- INTANOO, P.; RANGSANVIGIT, P.; MALAKUL, P. & CHAVADEJ, S. (2014). Optimization of separate hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) system under thermophilic operation. *Bioresource Technology*, 173, 256-265.
- INTANOO, P.; RANGSUNVIGIT, P.; NAMPROHM, W.; THAMPRAJAMCHIT, B.; CHAVADEJ, J. & CHAVADEJ, S. (2012). Hydrogen production from alcohol wastewater by an anaerobic sequencing batch reactor under thermophilic operation: Nitrogen and phosphorous uptakes and transformation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 11104-11112.
- JENKINS, S.; MORGAN, J. & SAWYER, C. (1983). Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 448-453.
- KIM, T. H.; LEE, Y.; CHANG, K. H. & HWANG, S. J. (2012b). Effects of initial lactic acid concentration, HRTs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. *Bioresour Technol*, 103, 136-41.
- KOTSOPOULOS, T. A.; ZENG, R. J. & ANGELIDAKI, I. (2006). Biohydrogen production in granular up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors with mixed cultures under hyper-thermophilic temperature (70°C). *Biotechnology and Bioengineering*, 94, 296-302.
- KUMAR, G.; SIVAGURUNATHAN, P.; PARK, J.-H.; PARK, J.-H.; PARK, H.-D.; YOON, J.-J. & KIM, S.-H. (2016). HRT dependent performance and bacterial community population of granular hydrogen-producing mixed cultures fed with galactose. *Bioresource Technology*, 206, 188-194.
- LÓPEZ TORRES, M.; VILLA GÓMEZ, P. M. & ESCOBEDO, R. (2004). El comportamiento de reactores anaerobios de residuos sólidos a través de ensayos microbiológicos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 35.
- LULLIO, T. G.; SOUZA, L. P.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A. & ZAIAT, M. (2014). Biomethane production in an AnSBBR treating wastewater from biohydrogen process. *Appl Biochem Biotechnol*, 174, 1873-96.
- MACHADO, W. D.; MARQUETTI, F.; MOLINA, F.; GUSILS, C. & QUAIA, E. A. (2016). Caracterización de lodos como inoculantes para un reactor anaeróbico para el tratamiento de vinaza. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 93, 13-17.

- MARTÍN-GONZÁLEZ, L.; FONT, X. & VICENT, T. (2013). Alkalinity ratios to identify process imbalances in anaerobic digesters treating source-sorted organic fraction of municipal wastes. *Biochemical Engineering Journal*, 76, 1-5.
- MÉNDEZ, C. (2001). *Metodología. Diseño y desarrollo del proceso de investigación*, México.
- MENG, X.; YUAN, X.; REN, J.; WANG, X.; ZHU, W. & CUI, Z. (2017). Methane production and characteristics of the microbial community in a two-stage fixed-bed anaerobic reactor using molasses. *Bioresource Technology*, 241, 1050-1059.
- MICHAUD, S.; BERNET, N.; BUFFIERE, P. & DELGENES, J. (2005). Use of the methane yield to indicate the metabolic behaviour of methanogenic biofilms. *Process Biochemistry*, 40, 2751-2755.
- MICHAUD, S.; BERNET, N.; BUFFIÈRE, P.; ROUSTAN, M. & MOLETTA, R. (2002). Methane yield as a monitoring parameter for the start-up of anaerobic fixed film reactors. *Water Research*, 36, 1385-1391.
- MOTA, V. T.; FERRAZ JUNIOR, A. D. N.; TRABLY, E. & ZAIAT, M. (2018). Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible? *Water Res*, 128, 350-361.
- PALACIOS-RUIZ, B.; MÉNDEZ-ACOSTA, H. O.; ALCARAZ-GONZÁLEZ, V.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, V. & PELAYO-ORTIZ, C. (2008). Regulation of Volatile Fatty Acids and Total Alkalinity in Anaerobic Digesters. *IFAC Proceedings Volumes*, 41, 13611-13616.
- PARK, J.-H.; KUMAR, G.; PARK, J.-H.; PARK, H.-D. & KIM, S.-H. (2015). Changes in performance and bacterial communities in response to various process disturbances in a high-rate biohydrogen reactor fed with galactose. *Bioresource Technology*, 188, 109-116.
- PÉREZ, A. & TORRES, P. (2008). Indices de alcalinidad para el control del tratamiento anaerobio de aguas residuales fácilmente acidificables. *Revista Ingeniería y Competitividad*, 10, 41-52.
- PÉREZ, A.; TORRES, P. & PIZARRO, C. (2006). Arranque de un filtro anaerobio para el tratamiento de aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca: influencia del inóculo. *Ingeniería y Competitividad*, 8, 47-54.
- PEREZ, A.; TORRES, P. & SILVA, J. (2009). Anaerobic treatment of cassava starch extraction wastewater. Optimization of environmental and operational variables. *DYNA*, 76, 139-148.
- 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, 139-148.
- RIPLEY, L.; BOYLE, W. & CONVERSE, J. (1986). Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 406-411.
- ROJAS-CHACÓN, O. (1999). *Evaluación del comportamiento de tres sistemas de tratamiento anaerobia para la depuración de las aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca*. Maestria, Universidad del Valle.
- ROJAS, O. (1999). *Evaluación del comportamiento de tres sistemas de tratamiento anaerobio para la depuración de las aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca*. Cali, Colombia: Universidad del Valle, Posgrado en Ingeniería Sanitaria y Ambiental.
- ROSA, P. R. F.; SANTOS, S. C.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. & SILVA, E. L. (2014b). Hydrogen production from cheese whey with ethanol-type fermentation: Effect of hydraulic retention time on the microbial community composition. *Bioresource Technology*, 161, 10-19.
- ROZZI, A. (1986). Parámetros de operación y control de los procesos anaerobios. *Tercer Seminario sobre depuración anaeróbica de aguas residuales*, Valladolid, España.
- SALEM, A. H.; MIETZEL, T.; BRUNSTERMANN, R. & WIDMANN, R. (2017). Effect of cell immobilization, hematite nanoparticles and formation of hydrogen-producing granules on

- biohydrogen production from sucrose wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 25225-25233.
- SCHMIDT, T.; ZIGANSHIN, A. M.; NIKOLAUSZ, M.; SCHOLWIN, F.; NELLES, M.; KLEINSTEUBER, S. & PRÖTER, J. (2014). Effects of the reduction of the hydraulic retention time to 1.5 days at constant organic loading in CSTR, ASBR, and fixed-bed reactors – Performance and methanogenic community composition. *Biomass and Bioenergy*, 69, 241-248.
- SI, B.; LI, J.; LI, B.; ZHU, Z.; SHEN, R.; ZHANG, Y. & LIU, Z. (2015). The role of hydraulic retention time on controlling methanogenesis and homoacetogenesis in biohydrogen production using upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and packed bed reactor (PBR). *International Journal of Hydrogen Energy*, 40, 11414-11421.
- SPEECE, R. E. (1983). Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environmental science & technology*, 17, 416A-427A.
- SREETHAWONG, T.; CHATSIRIWATANA, S.; RANGSUNVIGIT, P. & CHAVADEJ, S. (2010). Hydrogen production from cassava wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor: Effects of operational parameters, COD:N ratio, and organic acid composition. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 4092-4102.
- TÄHTI, H.; KAPARAJU, P. & RINTALA, J. (2013). Hydrogen and methane production in extreme thermophilic conditions in two-stage (upflow anaerobic sludge bed) UASB reactor system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 4997-5002.
- TORRES, P.; CAJIGAS, A. & PÉREZ, A. (2005a). Importancia del pH y la alcalinidad en el tratamiento anaerobio de las aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca. *Ciencias*.
- TORRES, P. & PÉREZ, A. (2010). Specific methanogenic activity: a tool for control and optimization of anaerobic wastewater treatment system (in Spanish: 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.
- TORRES, P.; RODRIGUEZ, J. & URIBE, I. E. (2003). Tratamiento de aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca en filtro anaerobio: influencia del medio de soporte. *Scientia et Technica*, 3.
- VAN HAANDEL, A. C. (1994). Influence of the digested COD concentration on the alkalinity requirement in anaerobic digesters. *Water Science and Technology*, 30, 23-34.
- VOLPINI, V.; LOVATO, G.; ALBANEZ, R.; RATUSZNEI, S. M. & RODRIGUES, J. A. D. (2018). Biomethane generation in an AnSBBR treating effluent from the biohydrogen production from vinasse: Optimization, metabolic pathways modeling and scale-up estimation. *Renewable Energy*, 116, 288-298.
- WANG, Y.; MU, Y. & YU, H.-Q. (2007). Comparative performance of two upflow anaerobic biohydrogen-producing reactors seeded with different sludges. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 1086-1094.
- WANG, Y.; ZHANG, Y.; WANG, J. & MENG, L. (2009). Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. *Biomass and Bioenergy*, 33, 848-853.
- XING, D.; REN, N. & RITTMANN, B. E. (2008). Genetic diversity of hydrogen-producing bacteria in an acidophilic ethanol-H₂-coproducing system, analyzed using the [Fe]-hydrogenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 1232-1239.
- XU, Z.; ZHAO, M.; MIAO, H.; HUANG, Z.; GAO, S. & RUAN, W. (2014). In situ volatile fatty acids influence biogas generation from kitchen wastes by anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 163, 186-192.

ZHANG, A. & YANG, S. T. (2009). Engineering *Propionibacterium acidipropionici* for enhanced propionic acid tolerance and fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, 104, 766-773.

Capítulo 6 Conclusiones finales y recomendaciones

De acuerdo con los objetivos inicialmente propuestos y conforme con los resultados obtenidos, las principales conclusiones derivadas del presente trabajo son:

- i) El pretratamiento térmico de 85°C durante 30 min aplicado a un inóculo mixto proveniente de reactor UASB que trata el efluente de un centro de sacrificio de ganado, inhibió inicialmente en un alto porcentaje (mayor al 97%) la actividad de arqueas metanogénicas. Sin embargo, se observó un recrecimiento de estos microorganismos, el cual fue incentivado por factores tales como la acumulación de sustratos favorables para su recrecimiento, como la disponibilidad de acetato o la mezcla de hidrógeno + dióxido de carbono, que promueven la metanogénesis acetoclástica e hidrogenotrófica. De acuerdo con esto, resulta necesario complementar el efecto inicial del pretratamiento térmico con métodos operacionales que eviten a largo plazo, el recrecimiento de microorganismos consumidores de hidrógeno (BCH) y facilitar la producción fermentativa de hidrógeno.
- ii) El pH inicial o pH de la fermentación tuvo un efecto significativo sobre el HY a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. Para este sustrato, en condiciones de flujo discontinuo, un pH entre 5,4 y 5,0 mejoró el HY frente a valores de pH más cercanos a la neutralidad. Detrás de este resultado, subyace un interés secundario para la producción fermentativa de hidrógeno a partir del sustrato referido, debido a que reduce los requerimientos de un alcalinizante puesto que el sustrato en mención se caracteriza por presentar valores de pH entorno de 4,5. El máximo HY observado en condiciones de flujo discontinuo fue de 1,25 mol H₂. mol⁻¹ CH. Este valor difiere significativamente del máximo teórico (4,0 mol H₂. mol⁻¹ CH), probablemente por la ocurrencia de rutas metabólicas no productoras de hidrógeno. No obstante, este resultado permite establecer que es posible la producción de hidrógeno fermentativo a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca y que el incremento del HY deberá ser potenciado a través del estudio de otras variables que influyen sobre el metabolismo de las BPH.
- iii) El estudio del efecto de la relación sustrato/biomasa (relación S/X) sobre el HY arrojó resultados interesantes con relación a como el tipo de sustrato tiene un efecto preponderante sobre las rutas metabólicas. Razón por la cual, resulta de vital importancia realizar las evaluaciones relacionadas con la producción biológica de hidrógeno con sustratos reales. El máximo HY observado en esta evaluación fue de 1,98 mol.mol⁻¹ CH con una relación S/X de 2,0 g DQO.g⁻¹ SV y pH inicial de 5,2 ± 0,2. Este valor de HY fue superior al encontrado en la evaluación del efecto del pH inicial sobre el HY, lo que significó un avance en la identificación y definición de los rangos en los cuales las variables de operación mejoran el HY a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca.
- iv) En condiciones de flujo continuo, se evidenció la fuerte interferencia que ejerce la composición del sustrato sobre el HY. Más aún, del efecto adverso que las impurezas propias de los sustratos reales ejercen sobre la evolución de las rutas metabólicas. En este caso, las bacterias ácido lácticas (BAL) que hacen parte de la microbiota autóctona de la yuca pudieron ejercer una competencia por el sustrato, obstaculizando el desarrollo de la fermentación oscura y causando fuertes variaciones en la producción volumétrica de biogás y producción volumétrica de hidrógeno. Las interferencias ejercidas por el sustrato no permitieron determinar el efecto de la variación de COV sobre el HY. No obstante, a través del análisis global del desempeño del RA fue posible identificar una mejor estabilidad y control operacional del reactor operado con la COVe0,8 y COVe1,5 g CH.g⁻¹ SV.d⁻¹.

- v) La formación GPH, como un hallazgo fortuito de esta investigación, se constituyó en el principal criterio para seleccionar la COVe de $0,8 \text{ g CH.g}^{-1} \text{ SV.d}^{-1}$ acompañada de un pH en torno de $5,2 \pm 0,2$ y TRH de 8 h, como las condiciones operacionales del RA, más apropiadas para continuar evaluando la producción de hidrógeno a partir de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. Con esas condiciones operacionales la máxima producción volumétrica de hidrógeno fue $491 \text{ mL H}_2.\text{L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ y el mayor HY fue $0,9 \text{ mol H}_2.\text{mol}^{-1} \text{ CH}$.
- vi) A diferencia de la biomasa flocúlenla, los GPH tienen mayor resistencia al efecto bactericida de las BAL. Por lo tanto, la granulación representa una alternativa, frente a los procesos de esterilización del sustrato, para minimizar de forma natural la competencia por el sustrato que ejercen las BAL en los procesos de producción fermentativa de hidrógeno. Sin embargo, a largo plazo el aumento en el tamaño de los gránulos probablemente facilitó el recrecimiento de arqueas consumidoras de hidrógeno en el RA, afectando la producción de este gas, por lo que para aprovechar las ventajas de la granulación se deberán realizar estudios complementarios orientados a evitar el establecimiento de BCH dentro de los gránulos.
- vii) Con relación al arranque del RM previamente acoplado a un RA, se observó que la condición operacional más adecuada para producir metano y reducir la carga orgánica procedente del RA fue un TRH de 28 h y una COV de $4,8 \text{ g DQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Con esa condición operacional el RM presentó el mejor con relación al BY ($221 \pm 17 \text{ mL biogás.g DQO removida}$) y reducción de carga orgánica (60,3%). Sin embargo, las condiciones operaciones sugeridas solo representan el punto de partida para el acople del RM con el RA debido a que un contenido importante de materia orgánica representada en AGV ($1.328 \text{ mg A. Acético.L}^{-1}$) salió en el efluente del RM, lo que supone que un mayor BY y MY se puede alcanzar través del mejoramiento de las condiciones operacionales y ambientales.
- viii) Respecto a los índices de alcalinidad se encontró que un índice AI/AP de 0,4 fue adecuado para neutralizar los AGV en el afluente RM con el propósito de evitar la inhibición de la metanogénesis acetoclástica.
- ix) La producción continua de hidrógeno y metano a partir de la DA en dos fases del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca es posible. Sin embargo, se deben abordar paulatinamente estrategias de operación adecuadas para el control de estos procesos. Con relación al HY, su mejoramiento dependerá de la identificación y comprensión de los fenómenos que afectan el establecimiento de las rutas metabólicas productoras de hidrógeno. Sin embargo, los resultados de esta investigación señalan que la configuración del RA de crecimiento suspendido seleccionado como alternativa tecnológica para controlar el crecimiento de biomasa resultó acertada y que, además, los estudios realizados permitieron identificar un punto de partida para su operación en flujo continuo. Con relación a la producción de metano, la evaluación de un reactor anaerobio de crecimiento adherido y de flujo mixto, a través de su etapa de arranque, mostró que esta alternativa tecnológica se complementa adecuadamente con el RA de crecimiento suspendido, debido a que permite reducir la carga orgánica en términos de DQO y el contenido de SST, y producir metano a partir del efluente acidogénico.
- x) Aunque los resultados de esta investigación evidenciaron que hay limitaciones para producir hidrógeno fermentativo a partir del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, como resultado del desconocimiento o necesidad de profundizar en temas específicos relacionados con la conservación de las rutas metabólicas y las poblaciones microbianas dominantes, existe un

interés creciente para incorporar este proceso como una estrategia de valorización energética, que a largo plazo redunde en un beneficio ambiental y económico para un sector agroindustrial, que, en el caso de Colombia, se ubica en zonas rurales que actualmente no pueden soportar los costos de tecnologías robustas.

Con relación a estudios futuros que permitan avanzar en el mejoramiento del HY y MY a partir de la DA en dos fases del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, se sugieren las siguientes recomendaciones:

- i) Determinar la relación C:N:P óptima para mejorar el HY y MY a través de la DA en dos fases del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. Este parámetro no fue evaluado en este estudio debido a que investigaciones previas con un interés distinto a la producción de hidrógeno y metano mostraron que el sustrato en cuestión contenía una relación de C:N:P suficiente para desarrollar la **DA** en una y dos fases.
- ii) Evaluar la influencia de la COVe sobre el HY a través del incremento de la concentración del sustrato, debido a que esta variable depende tanto de la concentración del sustrato como de la concentración de la biomasa. Para sustratos más concentrados podría resultar de interés diferenciar cuál de los dos términos tiene mayor incidencia. En este caso se seleccionó la concentración de la biomasa debido a que el agua residual fue catalogada como parcialmente diluida. Este estudio permitiría conocer los límites de carga orgánica a las cuales se puede someter la configuración del RA propuesto en este trabajo y su posible efecto sobre el control de BCH, que en condiciones de alta carga orgánica pueden disminuir su actividad metabólica.
- iii) Investigar una nueva configuración del RM de crecimiento adherido y flujo mixto para mejorar la captación del biogás. La inserción de tuberías sumergibles interconectadas o la independización de las cámaras que lo conforman podría optimizar la liberación del biogás y con ello mejorar el registro volumétrico.
- iv) Evaluar la influencia del medio de soporte y su configuración sobre el RM a partir del efluente acidogénico de un reactor alimentado con agua residual del del proceso de extracción de almidón de yuca. Debido a que uno de los objetivos del acople entre los dos reactores anaerobios es la producción de metano, es necesario mejorar su liberación y captación, lo cual puede lograrse a través de un estudio del tipo y organización del medio de soporte.
- v) Estudiar los grupos microbianos dominantes en el RA y RM para comprender e identificar las limitaciones y deficiencias ambientales o nutricionales que se presentan en el sistema. Esta información es clave para reducir los aspectos limitantes del HY y MY a través de la DA en dos fases del agua residual del del proceso de extracción de almidón de yuca.
- vi) Analizar el efecto de las sales sobre el desempeño de la producción biológica de hidrógeno y metano a partir de la DA en dos fases del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca. La adición de los *buffers* de fosfato y bicarbonato de sodio incrementaron el contiene sólidos disueltos que de forma natural se encuentran en el sustrato en cuestión. Debido a la fuerte inhibición que los cationes (Na^+) pueden ocasionar sobre las células

microbianas, resulta de gran importancia comprender los límites a los cuales son sometidos los microorganismos con la adición de los alcalinizantes.