

UNIVERSIDAD DEL VALLE
ESCUELA DE INGENIERÍA DE RECURSOS NATURALES Y DEL AMBIENTE
INGENIERIA SANITARIA Y AMBIENTAL

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PRETRATAMIENTO QUÍMICO DE UN
INÓCULO PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A TRAVÉS DE LA
FERMENTACIÓN OSCURA DE VINAZA

TRABAJO DE GRADO

MANUELA CHÁVARRO GIRÓN
CÓDIGO: 1330459
JUAN CARLOS BAHAMÓN PINZÓN
CÓDIGO: 1426197

DIRECTORAS
JENNY RODRÍGUEZ VICTORIA
TATIANA MAÑUNGA

SANTIAGO DE CALI, 05 DE SEPTIEMBRE DE 2019

Dedicamos este trabajo a quien lo esté leyendo, para hacer de este mundo
un lugar mejor.

AGRADECIMIENTOS

A la Profesora **Jenny Rodríguez V.**, directora del trabajo de grado por su orientación, paciencia y exigencia durante el desarrollo de la investigación y redacción del documento.

A la Profesora **Tatiana Mañunga.**, directora del trabajo de grado por su apoyo y orientación durante el desarrollo de la investigación y procesamiento de los datos.

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

A la **familia**, por su apoyo cada día, por celebrar en nuestros logros e impulsarnos en nuestros fracasos.

Tabla de contenido

1	INTRODUCCIÓN	11
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivo general	14
2.2	Objetivos específicos	14
3	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	Producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura.....	15
3.1.1	Microbiología de la producción de hidrógeno	15
3.1.2	Rutas metabólicas en producción de hidrógeno	17
3.1.3	Factores que afectan la producción de hidrógeno	21
3.2	Pretratamiento del inóculo.....	24
3.2.1	Métodos de pretratamiento	24
3.2.2	Pretratamiento químico.....	26
3.3	Vinaza	31
3.3.1	Caracterización.....	32
3.3.2	Impactos ambientales y disposición final.....	32
3.3.3	Vinaza en la producción de hidrógeno.....	34
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
4.1	Sustrato e inóculo	36
4.2	Adaptación del inóculo	37
4.3	Unidad experimental	38
4.4	Pretratamiento del inóculo.....	38
4.5	Ensayos de potencial bioquímico de hidrógeno-PBH.....	40
4.5.1	Ensayos preliminares para determinar condiciones del montaje	44
4.5.2	Ensayo de PBH para determinar el pH, reactivo químico y tiempo de exposición que genere mayor producción de biogás.....	46
4.5.3	Ensayo de PBH para estudiar el pre tratamiento óptimo	47
4.6	Métodos analíticos	47
4.6.1	Manejo de datos	49
4.6.2	Análisis estadístico	50
5	ANÁLISIS DE RESULTADOS	52

5.1	Efecto del pretratamiento químico del inóculo sobre el volumen de biogás	52
5.2	Efecto de cada factor en la generación de volumen de biogás	54
5.2.1	Efecto de la combinación entre los factores sobre el volumen de biogás generado	54
5.2.2	Análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significancia de cada factor e interacción	56
5.2.3	Determinación y evaluación de las variables cinéticas de Gompertz para establecer el efecto de los factores en cada fase de la curva de generación de biogás.....	58
5.3	Composición de biogás	60
5.3.1	Evaluación del efecto de los factores sobre la fracción de hidrógeno en el biogás	61
5.3.2	Evaluación del efecto de los factores sobre la eficiencia de generación de H ₂	63
5.4	Evaluación del mejor pretratamiento utilizando sacarosa como sustrato .	65
5.4.1	Variables de Gompertz	65
5.4.2	Composición de biogás	66
5.4.3	Eficiencia de producción de H ₂	67
6	CONCLUSIONES	68
7	RECOMENDACIONES.....	70
8	BIBLIOGRAFÍA.....	71
9	ANEXOS.....	84
9.1	Anexo 1.....	84
9.2	Anexo 2.....	86
9.3	Anexo 3.....	92

Índice de tablas

Tabla 3.1. Comparación de métodos de pretratamiento para la selección de bacterias productoras de H_2 a partir de cultivos mixtos de bacterias	25
Tabla 3.2. Resultados obtenidos tras la aplicación de pretratamientos químicos	27
Tabla 3.3 Pretratamiento de inóculos con HCl para producción de hidrógeno	29
Tabla 3.4. Composición química de la vinaza proveniente de diferentes materias primas	33
Tabla 3.5. Rendimientos en la generación de hidrógeno a partir del procesamiento de caña de azúcar alcanzados en diferentes estudios	35
Tabla 4.1 Caracterización de la vinaza diluida al 15%	36
Tabla 4.2 Relación volumétrica para mezcla de sustratos	37
Tabla 4.3. Características del inóculo adaptado	38
Tabla 4.4. Tratamiento del ensayo	40
Tabla 4.5 Volumen de lodo y sustrato adicionado a cada "Tratamiento"	42
Tabla 4.6 Concentración de sustrato y remoción de DQO	45
Tabla 4.7 Métodos a emplear para la caracterización de la vinaza	48
Tabla 4.8 Métodos a emplear para la caracterización del inóculo adaptado y pretratado	48
Tabla 5.1. Análisis de varianza para un diseño experimental de 2^3 factorial	56
Tabla 5.2. Parámetros cinéticos de las curvas de producción acumulada de Biogás	59
Tabla 5.3. Método de comparación de Tukey	60
Tabla 5.4. Composición de biogás en reactores con mejor rendimiento para la generación de biogás	60
Tabla 5.5. Fracción de hidrógeno en el biogás por cada factor experimental	62
Tabla 5.6. Determinación de la eficiencia de generación de H_2	63
Tabla 5.7. Parámetros de Gompertz para el Ensayo de PBH con pretratamiento H_2SO_4 -6 horas a pH 2 y sacarosa	66
Tabla 5.8. Composición de biogás para reactores con mayor volumen máximo durante Ensayo de PBH para estudiar el pre tratamiento óptimo	66
Tabla 5.9. Eficiencia de producción de H_2 para la fermentación de sacarosa	67
Tabla 9.1. Condiciones iniciales del experimento	84
Tabla 9.2. Características físico-químicas iniciales y finales del sobrenadante por reactor	85
Tabla 9.3. Comportamiento de las presiones en el ensayo de PBH para evaluación de los pretratamientos	86
Tabla 9.4. Comportamiento de las presiones en el ensayo de PBH del pre tratamiento óptimo - H_2SO_4 , pH2, 6h	87
Tabla 9.5. Comportamiento del volumen de biogás en el ensayo de PBH para evaluación de los pretratamientos	88
Tabla 9.6. Comportamiento del volumen de biogás en el ensayo de PBH para estudiar el pre tratamiento óptimo - H_2SO_4 , pH2, 6h	89

Tabla 9.7. Composición de biogás en el ensayo de PBH para evaluación de los pretratamientos y en el ensayo de PBH para estudiar el pre tratamiento óptimo - H_2SO_4 , pH2, 6h	90
Tabla 9.8. Cálculo para determinación de eficiencia de generación de hidrógeno por mol de glucosa	91
Tabla 9.9. Análisis de Varianza de Modelo linear general: P(mL) vs Factores y combinaciones	92
Tabla 9.10. Análisis de Varianza de Modelo linear general: Rm(mL/h) vs Factores y combinaciones.....	92
Tabla 9.11. Análisis de Varianza de Modelo linear general: $\lambda(h)$ vs Factores y combinaciones	93

Índice de figuras

Figura 3.1. Etapas del Desarrollo morfológico del ciclo de vida de la B. subtilis ..	16
Figura 3.2 Pasos de biodegradación y rutas metabólicas involucradas en la fermentación para la degradación de biomasa. La líneas de puntos, continua y discontinua representan la ruta de los monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos respectivamente.	18
Figura 3.3. Rutas metabólicas típicas para la conversión de un sustrato en hidrógeno durante la fermentación oscura. (NADH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida. PFOR: Piruvato ferredoxina oxidoreductasa. PFL: Piruvato formato liasa)	19
Figura 3.4 Producción acumulada de H_2 a partir de lodo anaerobio pretratado con diferentes ácidos fuertes a pH2. (Barras de error indican la desviación estándar) 31	31
Figura 3.5 Diagrama de flujo de los procesos de producción de etanol, primera y segunda generación integrados	32
Figura 4.1 Reactor de aclimatación. a) Configuración del reactor de aclimatación, b) Control de temperatura y luz en el reactor de aclimatación	38
Figura 4.2. Unidad experimental y representación gráfica. a) Capuchón, b) Agrafe, c) Frasco de vidrio, d) Agitador, e) Esquema de unidad experimental	39
Figura 4.3. Registro fotográfico del montaje realizado. a) Cápsulas después del ensayo de sólidos volátiles; b) Reactores con lodo a punto de ser alimentados con vinaza 15%.....	41
Figura 4.4 Reactores ubicados en la incubadora del laboratorio de lodos	42
Figura 4.5 Manómetro empleado en el montaje	43
Figura 4.6. Curva teórica de presiones totales	43
Figura 4.7 Extracción e inyección de biogás. a) reactor del que es extraído el biogás; b) Inyección del biogás en los viales Exetainer	44
Figura 4.8 Nomenclatura de los reactores.....	46
Figura 4.9 Configuración del ensayo de PBH para estudiar el pretratamiento óptimo	47
Figura 4.10. Representación geométrica del diseño factorial 2^3	50

Figura 5.1. Volumen acumulado de biogás del Ensayo.....	53
Figura 5.2. Diagrama de valores individuales de volumen máximo de biogás generado por cada pretratamiento	54
Figura 5.3. Interacción de reactivo químico y pH para la generación de volumen de biogás.....	55
Figura 5.4. Interacción de pH y reactivo químico con el tiempo para la generación de biogás.....	55
Figura 5.5. Prueba de normalidad para los valores de volumen máximo acumulado.....	57
Figura 5.6. Volumen acumulado de biogás del Ensayo para estudiar el mejor pretratamiento	¡Error! Marcador no definido.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGV's: Ácidos grasos volátiles

PBH: Potencial bioquímico de hidrógeno

AR: Agua residual

atm: Atmósfera

CaCO₃: Carbonato de calcio

CH: Carbohidratos

CH₄: Metano

CO₂: Dióxido de carbono

d: Día

DQO: Demanda Química de Oxígeno

g: Gramo

HCl: Ácido clorhídrico

H₂: Hidrógeno

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

kg: Kilogramo

L: Litro

N: Normalidad

NaOH: Hidróxido de Sodio

Na₃HPO₄: Fosfato de Sodio

P_s: Producción de hidrógeno

R_m: Tasa máxima de producción de hidrógeno

RQ: Reactivo químico

SV: Sólidos volátiles

ST: Sólidos totales

TRH: Tiempo de retención hidráulico

UASB: Del ingles Upflow Anaerobic Sludge Blanket. Reactor anaerobio de flujo ascendente con manto de lodos

°C: Grados Celsius

λ: Fase de latencia

%: Porcentaje

RESUMEN

El hidrógeno es el combustible que cuenta con la más alta eficiencia energética, cuya combustión tiene como subproductos vapor de agua y energía. La generación de hidrógeno a través de la fermentación oscura de agua residual agroindustrial propone una simbiosis entre la industria agrícola y la energética, donde los residuos de una industria se convierten en la materia prima de la otra. De acuerdo con esto, la vinaza es un subproducto de la generación de etanol caracterizado por tener una carga orgánica que le proporciona alta capacidad contaminante, lo cual la convierte en un sustrato ideal para su aprovechamiento a través de la fermentación oscura mediante para la generación de hidrógeno.

En este trabajo de investigación se evaluó el efecto del pretratamiento químico sobre un inóculo para la producción de hidrogeno a través de la fermentación oscura de la vinaza. Se estudiaron los factores: ácido (H_2SO_4 - HCl), pH (2 - 3) y tiempo de exposición (6 horas – 24 horas), para determinar las condiciones de pretratamiento que permiten obtener una mayor generación de hidrógeno.

Se utilizó como inóculo lodo del reactor UASB de la PTAR del matadero de CAVASA, previo al pretratamiento se llevó a cabo una adaptación progresiva del inóculo a la vinaza. Para iniciar el pretratamiento se adiciona el ácido al inóculo hasta alcanzar el valor de pH correspondiente, una vez concluido el tiempo de exposición se adiciona Na_3HPO_4 como alcalinizante hasta alcanzar un pH de 5,3 para dar por terminado el pretratamiento.

Para realizar los ensayos en los que se evaluó el potencial bioquímico de hidrógeno se adicionó al reactor el inóculo pretratado y el sustrato (vinaza al 15%) en proporciones que permitieran mantener una relación carbohidratos:SV de 2:1, posteriormente se sellaron de forma hermética los reactores y se dio inicio a la agitación. Se realizó el monitoreo de la generación de H_2 de manera indirecta, a través de la medición de la presión de biogás. A partir de esta información se generaron curvas de presión y volumen en función del tiempo, y se tomaron las muestras de biogás en viales Exetainer estériles y sellados al vacío. Los resultados mostraron que la generación de hidrógeno se ve afectada principalmente por el tiempo de exposición al pretratamiento. Tras comparar los resultados obtenidos para cada pretratamiento se determina que el pretratamiento óptimo fue pH 2 por 6 horas utilizando H_2SO_4 .

Aplicando el pretratamiento óptimo, al utilizar vinaza como sustrato, se obtuvo una producción de $0,0303 \text{ mol H}_2/\text{L}_{\text{sustrato}}$, fracción de hidrógeno en el biogás $0,47 \text{ mol H}_2/\text{mol biogás}$, y eficiencia para la generación de hidrógeno de $0,77 \text{ mol H}_2/\text{mol glucosa}$. Al utilizar sacarosa como sustrato, se obtuvo una producción de $0,177 \text{ mol H}_2/\text{L}_{\text{sustrato}}$, fracción de hidrógeno en el biogás $0,71 \text{ mol H}_2/\text{mol biogás}$, y eficiencia para la generación de hidrógeno de $3,3 \text{ mol H}_2/\text{mol glucosa}$.

Palabras clave: Fermentación oscura, vinaza, Bio-hidrógeno, Pretratamiento químico de Inóculo

1 INTRODUCCIÓN

A partir del siglo XVIII con la llegada de la revolución industrial la demanda energética comenzó a tener un rol indispensable para el desarrollo de la sociedad. Desde entonces, se han utilizado diferentes fuentes de energía como el carbón, el petróleo crudo, gas natural, petróleo sintético (arenas y esquistos petrolíferos) y energía nuclear (Henry et al., 1999), las cuales se clasifican como no renovables, ya que una vez liberada la energía que contienen deberán transcurrir miles de generaciones humanas para que vuelvan a generarse (Puig y Corominas, 1990).

El uso de estas fuentes de energía desencadena un impacto ambiental y social, como por ejemplo la generación de subproductos de la combustión que contribuyen al cambio climático, debido a la emisión de gases de efecto invernadero (GEI), lo que provoca cambios en la radiación solar entrante, la radiación infrarroja saliente y en las propiedades de la superficie de la tierra que alteran el balance de energía del sistema climático (INEEL, 2009, IPCC, 2014).

A nivel mundial, desde 1991 a 2015, China ha tenido un rápido crecimiento en el consumo energético en kWh per cápita promedio del 9,6%, seguido de la India con un 4,7% y del 2,4% para Brasil. Por otra parte, Colombia se ubica en el octavo puesto con un consumo per cápita de 1.137 kWh en 2015, con respecto a las economías latinoamericanas más representativas (Valencia, 2017).

Teniendo en cuenta lo anterior, se hace evidente la necesidad de encontrar una fuente de energía renovable y sostenible, de fácil acceso y a un bajo costo.

El hidrógeno representa una alternativa prometedora para sustituir los combustibles convencionales ya que los productos de su combustión son vapor de agua y energía. Además, posee el mayor contenido energético por unidad de peso (122 a 142 kJ/g) comparado con cualquier combustible conocido (Kappeler, 1978, Domashenko et al., 2002). Este combustible puede ser producido mediante procesos termoquímicos como la electrólisis del agua, pirolisis de biomasa, reformado de gas natural y procesos biológicos como la fermentación oscura (Yang et al., 2015). En comparación con los procesos termoquímicos de obtención de hidrógeno, la fermentación oscura ofrece ventajas como condiciones de operación moderadas (35° y 1 atm) y la posibilidad de utilizar como sustratos, residuos agrícolas (Wang y Yin, 2017). A pesar de existir estudios que demuestran la viabilidad técnica de implementar la fermentación oscura para la producción de hidrógeno, ésta no se ha implementado a escala industrial (Khan et al., 2017).

La vinaza es un subproducto de la producción de etanol, donde se genera entre 10 y 15 L de vinaza por cada litro de etanol producido (Christofolletti et al., 2013). La vinaza tiene una carga orgánica (DQO: 50 a 150 g/L) que le proporciona capacidad contaminante, cuenta además con un pH ácido, cercano a 4,9 unidades. Estos valores pueden variar en función de la materia prima implementada en el proceso de producción, estas materias primas pueden ser: caña de azúcar en Suramérica (Hannon y Trenkle, 1990), remolacha, vino y frutas

en Europa, y maíz y tequila en América del Norte (Giachini y Ferraz, 2009, España et al., 2011). Los impactos ambientales de la generación de vinazas están relacionados principalmente con la emisión de gases de efecto invernadero, salinización del suelo, lixiviación de metales pesados y sulfato, y contaminación de agua subterránea, así como la generación de malos olores y la posible atracción de insectos (Moraes et al., 2015).

Con la intención de mitigar dos factores ambientales como lo son la contaminación por el uso de combustibles y la disposición final de la vinaza, estudios recientes han demostrado que la vinaza es un sustrato ideal para la generación de hidrógeno a través de la fermentación (Krysteva et al., 2010, Vlyssides et al., 2010, Tian et al., 2013, Moraes et al., 2015).

En el proceso de producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura, los azúcares son convertidos en H_2 , CO_2 y ácidos grasos volátiles (Sgobbi et al., 2016). Los reactores de producción de hidrógeno frecuentemente son inoculados con biomasa proveniente de reactores metanogénicos, ya que los microorganismos fermentativos con capacidad de producir hidrógeno como *Clostridium* spp. (anaerobia estricta), *Enterobacter* spp., *Bacillus* spp. y *Enterococcus* spp. (facultativas) generalmente se encuentran presentes (Sinha y Pandey, 2011, Barca et al., 2015, Kumari y Das, 2017, Wang y Yin, 2017). Un factor de éxito para la producción de hidrógeno es propiciar la ausencia de microorganismos consumidores del mismo durante el proceso. Por eso, es necesario realizar un pretratamiento del inóculo que se va a emplear para favorecer la presencia de bacterias productoras de hidrógeno.

Existen diferentes tipos de pretratamientos como el choque de calor, tratamiento ácido, tratamiento básico, inhibidores químicos (cloroformio, yodopropano, BESA y ácidos grasos), aireación, ultra-sonicación, microondas, radiación UV, radiación ionizante, congelación y descongelación, corriente eléctrica, carga-choque y el tratamiento combinado (Wang y Yin, 2017). El choque térmico es el más utilizado por su bajo costo y su eficiencia. En este pre tratamiento microorganismos consumidores de hidrógeno como los metanogénicos se inhiben eficazmente y los productores de hidrógeno *Clostridium* spp. se convierten en dominantes, lo que resulta en un alto rendimiento de hidrógeno (Baghchehsaraee et al., 2011, Cheng et al., 2011, Lay et al., 2012). Sin embargo, las bacterias homoacetogénicas formadoras de esporas, que son también un tipo principal de consumidor de hidrógeno, difícilmente pueden ser inhibidas por el tratamiento térmico (Oh et al., 2003). Además, con este método también se inhiben otros microorganismos que son útiles para la producción de hidrógeno, como *Bacillus* spp. y *Enterobacter* spp. (Wang y Yin, 2017).

Por otro lado, el pretratamiento químico es el segundo más utilizado, en este un bajo valor de pH provoca cambios en la carga eléctrica de la membrana celular afectando la actividad enzimática y la absorción de nutrientes (Moosbrugger et al., 1993). Los microorganismos metanogénicos son activos dentro de un rango reducido de pH (6,8 a 7,2) (Moosbrugger et al., 1993); las especies *Clostridium*

spp., *Enterobacter* spp. y *Bacillus* spp. toleran valores de pH entre 5,0 y 8,5, 4,0 y 7,5 y 5,3 y 7,4 respectivamente (Wang y Yin, 2017). Aunque este método ha probado ser efectivo en la inhibición de microorganismos productores de hidrógeno, es importante tener presente que el objetivo y desafío en la investigación y desarrollo de la fermentación oscura están enfocados principalmente en la obtención de altos rendimientos en la producción de hidrógeno bajo condiciones estables (Koskinen et al., 2007, Show et al., 2011).

En ese sentido, el presente trabajo busca evaluar el efecto de diferentes factores del pretratamiento químico (reactivos, pH y tiempo de exposición) aplicado a un inóculo proveniente de un reactor anaerobio, sobre la producción de H_2 a partir de la fermentación oscura de vinaza. Esta investigación se realizó también con la intención de proponer una relación de simbiosis entre la industria agroindustrial y la industria de la energía, teniendo en cuenta que la vinaza es un residuo de la producción de azúcar, la cual es una de las principales actividades económicas del valle del cauca.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del pretratamiento químico de un inóculo para la producción de hidrogeno a través de la fermentación oscura de la vinaza

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los ácidos H_2SO_4 y HCl para el pretratamiento químico de un inóculo que proporcione mayor potencial bioquímico de hidrogeno-PBH tratando vinaza
- Determinar el pH del pretratamiento químico de un inóculo que proporcione mayor PBH tratando vinaza
- Determinar el tiempo de exposición del compuesto químico para el pretratamiento químico de un inóculo, que proporcione mayor PBH tratando vinaza
- Seleccionar la combinación de ácido, pH y tiempo de exposición del pretratamiento químico que proporcione mayor PBH del inóculo

3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura

3.1.1 Microbiología de la producción de hidrógeno

La producción de hidrogeno es mediada por microorganismos anaerobios estrictos (*Clostridia*, methylotrophs, rumen bacteria, methanogenic bacteria, archaea, etc.), anaerobios facultativos (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*), e incluso aerobios (*Alcaligenes*, *Bacillus*) (Li y Fang, 2007).

Existe un especial interés en el género *Clostridium*., que incluye *C. butyricum*, *C. beijerinckii*, *C. welchii*, *C. thermolacticum*, *C. thermocellum*, *C. paraputrificum*, *C. pasteurianum*, *C. beijerinckii*, *Clostridium scatologenes*, *C. acetobutyricum*, y *C. bifermentans* (Kapdan y Kargi, 2006), porque ha sido identificado como dominantes en la producción de hidrógeno operando con un cultivo mixto mesofílico a un pH de 5,5 (Fang et al., 2002). Se caracterizan por su capacidad de adoptar formas no vegetativas, llamadas esporas, que permiten a las bacterias sobrevivir bajo condiciones ambientales hostiles, tales como temperaturas extremas, altos o bajos pH o la presencia de compuestos químicos peligrosos (Nandi y Sengupta, 1998), como resultado de esta propiedad, pueden ser separados de los demás microorganismos mediante pretratamiento sobre el inóculo. Adicionalmente, son capaces de usar diferentes sustratos orgánicos por ejemplo carbohidratos, aminoácidos y lípidos, lo que les permite ser eficientes en el tratamiento de agua residual (Elsharnouby et al., 2013). Según Khanal et al. (2004) estos microorganismos se pueden clasificar en C. Proteolíticos (degradan proteínas y aminoácidos) y C. Sacarolíticos (fermentan carbohidratos y producen H₂).

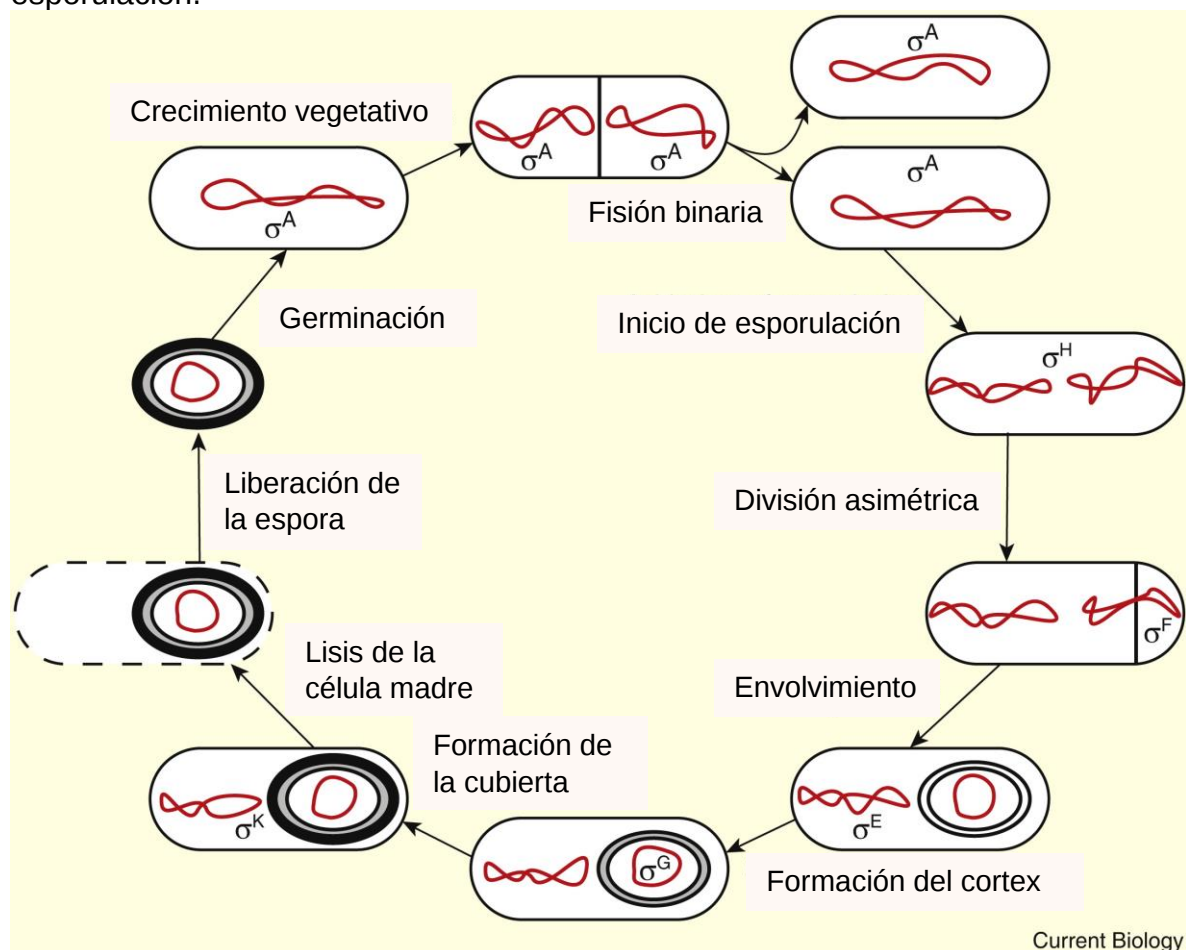
Fang et al. (2002) identificaron dentro del consorcio de microorganismos una composición de 64,6% microorganismos del genero *clostridium*, 18,8% *Enterobacteriaceae*, y 3,1% con *Streptococcus bovis* (*Streptococcaceae*) basados en un estudio filogenético de las secuencias de rDNA. EL 13,5% restante pertenece a ocho diferentes unidades taxonómicas operativas.

Rafrafi et al. (2013) reportaron que especies subdominantes, a pesar de su baja abundancia, pueden tener un impacto sustancial en el rendimiento de la producción de hidrógeno. La presencia de especies como *E. coli* puede incrementar el rendimiento de la producción de H₂, inclinando las rutas metabólicas a la generación de acetato y butirato.

Las esporas completamente formadas, reconocidas como la forma de vida más resistente del planeta (Nicholson et al., 2000), además de proteger el genoma bacteriano contra calor, desecación, radiación y oxidación, la formación de esporas puede ser una forma eficiente de escapar a la depredación por parte de organismos más grandes (Klobutcher et al., 2006, Laaberki y Dworkin, 2008). Para

conocer la forma como se desarrolla el proceso de esporulación de Hoon et al. (2010) detallan el desarrollo y diferenciación celular de la bacteria *Bacillus subtilis*., específicamente, los factores sigma de esporulación y el regulador maestro de la esporulación- Spo0A, los cuales se conservan en todas las bacterias consideradas como formadoras de esporas.

En un medio de cultivo nutritivo las células de *B. subtilis* se dividen por fisión binaria cada 30 minutos. Por el contrario, el deterioro de las condiciones ambientales desencadena la esporulación, un proceso que toma entre 8 y 10 horas aproximadamente. Por esto, la formación de endosporas representa una gran inversión de tiempo y energía y es considerada una herramienta de supervivencia utilizada como último recurso., las células *B. subtilis* solo llevan a cabo la esporulación tras haber fallado en la lucha por sobrevivir a través de todos los otros medios disponibles, tales como canibalismo o el establecimiento de unas condiciones genéticas competentes (González-Pastor et al., 2003, Süel et al., 2006, Veening et al., 2006). En la Figura 3.1 se esquematiza la ubicación temporal de cada actividad específica de compartimentación de cada factor sigma (σ) de esporulación.



Current Biology

Figura 3.1. Etapas del Desarrollo morfológico del ciclo de vida de la *B. subtilis*

Fuente: Adaptado de de Hoon et al. (2010)

Durante el crecimiento vegetativo, las células se dividen por fisión binaria para generar dos células hijas idénticas. En la célula esporuladora previa a la división, los cromosomas (rojo) están orientados a la región de origen más próxima anclada a los polos de las células.

Durante la división asimétrica, dos compartimientos delimitados por una membrana son generados: una pequeña pseudo espora y una célula madre grande. Tras la división asimétrica, el cromosoma restante de la pseudo espora (correspondiente a la región distal del origen) es halado dentro de la pseudo espora por traslocación. El envolvimiento de la pseudo espora por parte de la célula madre resulta en la liberación de la pseudo espora, como un protoplasto libre dentro de la célula madre. El córtex (compuesto de peptidoglucano, gris) es sintetizado en medio de las dos membranas que rodean a la pseudo espora. La cubierta de la espora (negro) es una compleja estructura hecha por al menos 70 diferentes proteínas, que se organizan alrededor de la superficie de la pseudo espora. Tras la lisis de la célula madre, la espora madura es liberada al ambiente. Las células *B. subtilis* pueden permanecer en estado de espora latente por largos periodos, pero las esporas germinarán en respuesta a la presencia de pequeñas moléculas (mono aminoácidos, azúcares o fragmentos de peptidoglucano) y continuará su crecimiento vegetativo (de Hoon et al., 2010).

Tan pronto como las condiciones ambientales se tornan favorables para el crecimiento vegetativo, es vital que la *B. subtilis* cese rápidamente su estado latente. A este proceso se le conoce como “*germinación*” (Setlow, 2003), y es desencadenado por la presencia de nutrientes en el ambiente. Los nutrientes son percibidos por receptores específicos en la membrana de la espora y, en cuestión de minutos, el núcleo de la espora se rehidrata, el córtex se hidroliza, y la cubierta de la espora se disipa. Finalmente, se inicia la replicación de ADN y a continuación se genera la primera división celular (de Hoon et al., 2010).

Algunos microorganismos indeseables, tales como *Bacillus* spp. y *Lactobacillus* spp. pueden disminuir el rendimiento en la generación de hidrógeno, ya sea consumiendo H_2 o inclinando las rutas metabólicas a la acumulación de lactato (Li y Fang, 2007, Raftai et al., 2013). Los principales consumidores de hidrógeno incluyen bacterias metanogénicas, homoacetogénicas y sulfato reductoras. La actividad de estos microorganismos puede ser controlada mediante pretratamientos sobre el inóculo o modificando las condiciones de operación del reactor (Wang y Wan, 2009, Guo et al., 2010).

3.1.2 Rutas metabólicas en producción de hidrógeno

La fermentación oscura de carbohidratos complejos llevada a cabo por un consorcio mixto, produce una amplia gama de intermediarios y productos secundarios, los cuales dependen de los parámetros operacionales y ambientales aplicados tales como, tipo de sustrato, carga orgánica, pH y temperatura. En la Figura 3.2 se tiene una representación esquemática de los diferentes pasos y

rutas bioquímicas involucradas en la fermentación oscura de compuestos orgánicos complejos (Ghimire et al., 2015).

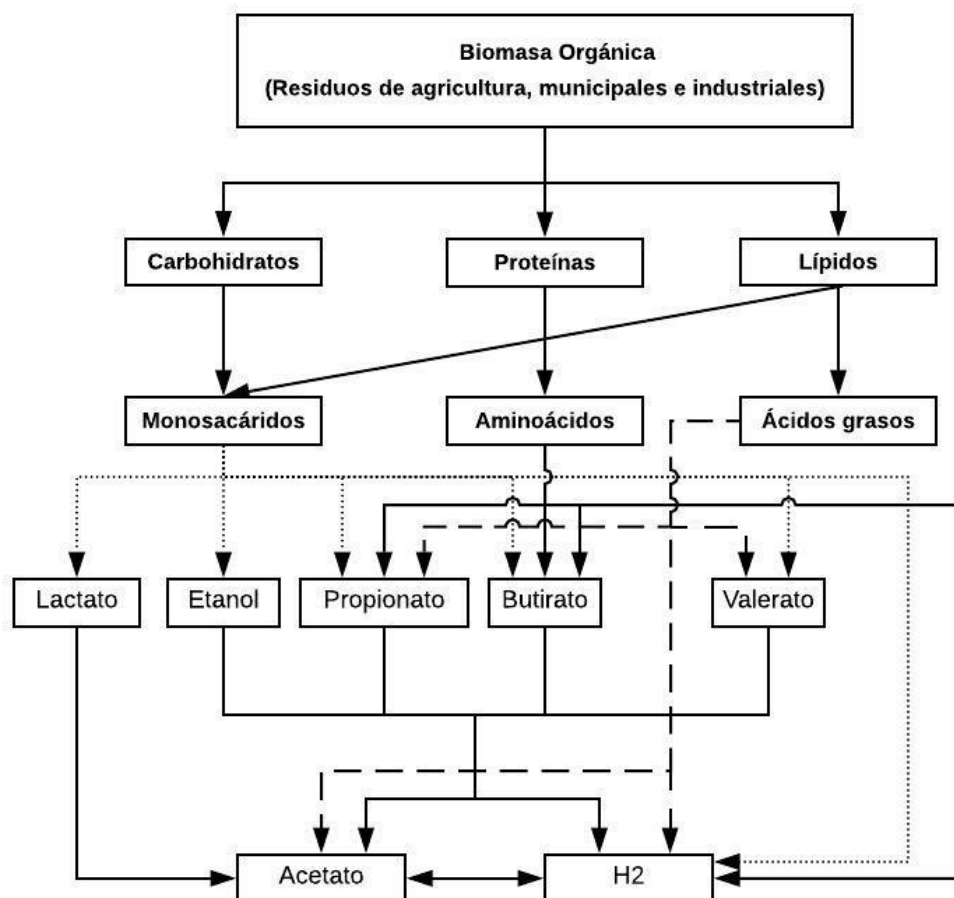
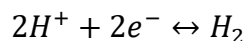


Figura 3.2 Pasos de biodegradación y rutas metabólicas involucradas en la fermentación para la degradación de biomasa. Las líneas de puntos, continua y discontinua representan la ruta de los monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos respectivamente.

Fuente: Ghimire et al. (2015)

De acuerdo con Łukajtis et al. (2018) el hidrógeno es el sustrato clave en el metabolismo de varios microorganismos anaerobios. Tales microorganismos son capaces de utilizar tanto las moléculas ricas en hidrógeno como, los electrones resultantes de la oxidación del hidrógeno, para generar energía.

En ausencia de aceptores externos de electrones, los organismos tienen exceso de electrones generados en el proceso metabólico, como resultado de la conversión de iones hidrógeno en hidrógeno molecular (Ecuación 3.1).



Ecuación 3.1

La enzima principal en la regulación del metabolismo para la generación de hidrógeno son las hidrogenasas. Las dos hidrogenasas que catalizan la reacción son FeFe y NiFe, las cuales son filogenéticamente diferentes, y tienen diferentes puntos activos. Las hidrogenasas FeFe además de ser sensibles al oxígeno, son más activas en la producción de hidrógeno molecular que las NiFe, que se encargan de catalizar la oxidación de hidrógeno molecular (Mishra et al., 2004, Hallenbeck, 2009).

Como se muestra en la Figura 3.3, el primer paso en el mecanismo de fermentación, en el que se genera hidrógeno a partir de glucosa es la glucólisis, en el que la glucosa es convertida a piruvato, intermediario clave con la consecuente generación de la forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH).

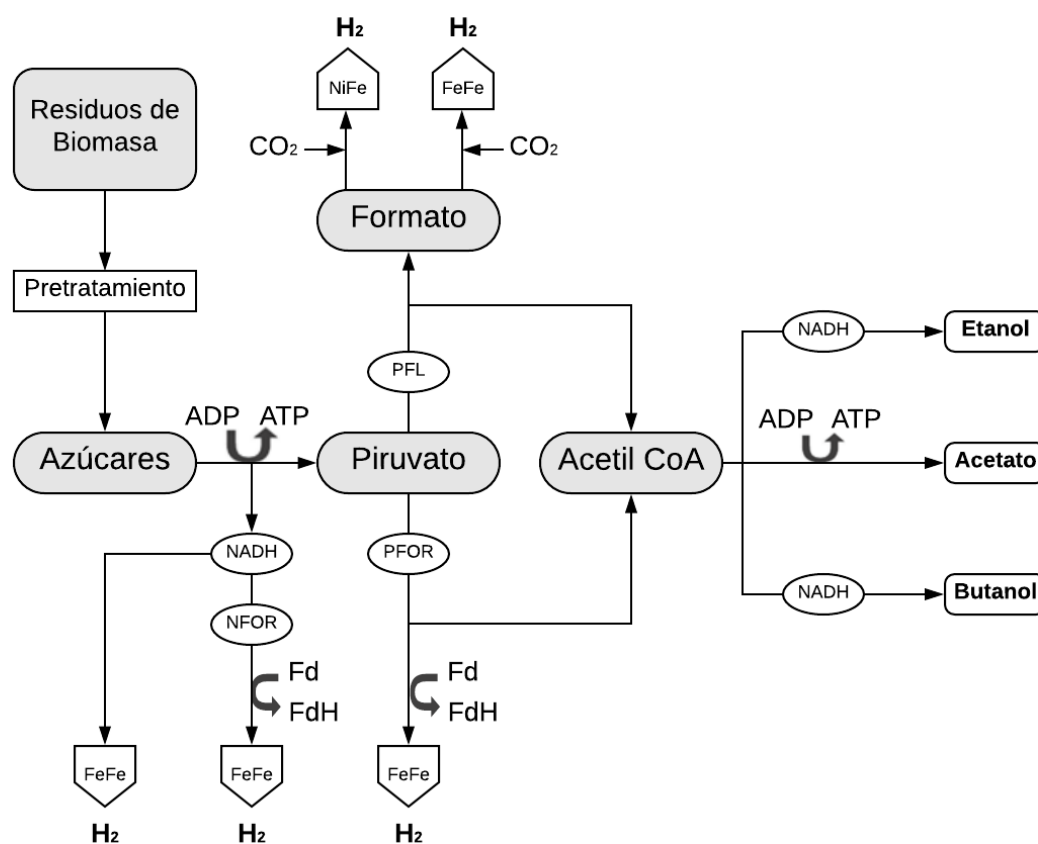


Figura 3.3. Rutas metabólicas típicas para la conversión de un sustrato en hidrógeno durante la fermentación oscura. (NADH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida. PFOR: Piruvato ferredoxina oxidoreductasa. PFL: Piruvato formato liasa)

Fuente: Łukajtis et al. (2018)

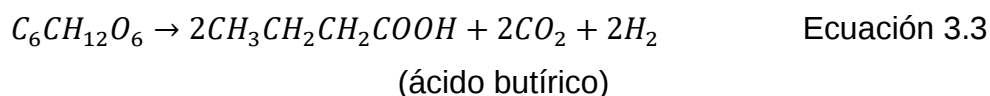
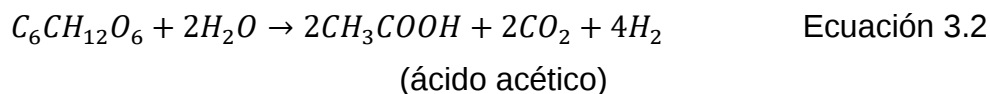
Bajo condiciones anaerobias, el piruvato puede ser convertido en acetyl-CoA en la reacción catalizada por piruvato ferredoxin oxidoreductasa (PFOR). Los productos

de la reacción además de acetyl-CoA y CO₂, incluye también ferredoxinas reducidas, involucradas en la reducción de hidrogenasas-[FeFe], que subsecuentemente reduce la generación de hidrógeno molecular a partir de iones hidrógeno. Otra posible ruta metabólica en la conversión de piruvato a acetyl-CoA con la consecuente generación de formiato, es la reacción catalizada por piruvato-formiato liasa (PFL). El formiato puede ser fácilmente convertido a hidrógeno y dióxido de carbono en presencia de hidrogenasas-[NiFe] o hidrogenasas-[FeFe]. La coenzima acetyl A puede ser convertida en diversos compuestos orgánicos, siendo productos de valor agregado de la fermentación (etanol, butanol, acetona, ácido butírico o ácido acético), con oxidación simultánea de NADH o la formación de ATP (Hawkes et al., 2007, Hallenbeck, 2012).

Existen dos tipos de fermentación dependiendo de los compuestos químicos que resulten como productos finales: butirato-butanol y ácidos mixtos (ácidos acético y fórmico). Los productos finales en la fermentación butirato-butanol incluyen ácido butírico, butanol, hidrógeno, dióxido de carbono y ácido acético, y otros compuestos tales como acetona, 2-propanol, etanol, ácido láctico, ácido capríónico o acetona (Hallenbeck, 2012). En la fermentación ácidos mixtos se genera ácido fórmico, ácido acético, etanol, hidrógeno, dióxido de carbono, ácido láctico y ácido succínico, glicerol, acetona y 2,3-butanodiol (Hallenbeck, 2012).

La cantidad de hidrogeno producido depende de la clase y cantidad de microorganismos presentes en el sistema, teóricamente las bacterias anaerobias facultativas pueden producir dos moles de hidrógeno por mol de glucosa, mientras que las anaerobias estrictas producen cuatro (Wang y Yin, 2017). Sin embargo, en la práctica experimental estudios han demostrado que se obtienen más de 2,6 mol H₂/mol hexosa por el género clostridium y no más de 2,0 mol H₂/mol hexosa por Enterobacter y Bacillus (Harun et al., 2012, Junghare et al., 2012, Beckers et al., 2013, Saady, 2013, Patel et al., 2015, Ortigueira et al., 2015).

Las reacciones bioquímicas comunes durante la fermentación oscura se presentan en las ecuaciones 3.2 y 3.3 (Ghimire et al., 2015):



Cuando los procesos metabólicos son tales que favorecen la producción de ácido acético, el rendimiento estequiométrico de H₂ es de 4 mol por cada mol de glucosa (544mLH₂/g hexosa a 25°C), mientras que el rendimiento cuando el producto final es el ácido butírico es 2 mol de H₂ por cada mol de glucosa (272mLH₂/g hexosa a 25°C) (Li y Fang, 2007).

El rendimiento real en la generación de hidrógeno es menor que el teórico, ya que parte del sustrato es utilizado en producción de biomasa, y la degradación de sustrato puede darse siguiendo rutas metabólicas que no involucran al hidrógeno como producto (Hallenbeck y Benemann, 2002, Nath y Das, 2004).

Bajo algunas condiciones, los procesos metabólicos pueden llevar a la producción de etanol y acetato, disminuyendo el rendimiento estequiométrico de la producción de H_2 a 2 mol por mol de glucosa (272mLH₂/g hexosa a 25°C) como se muestra en la Ecuación 3.4 (Li y Fang, 2007):



3.1.3 Factores que afectan la producción de hidrógeno

La formación del hidrógeno y ácidos orgánicos obedece a las condiciones ambientales en las cuales los microorganismos crecen (Bedoya et al., 2008), de esta manera la tasa de producción de hidrógeno puede ser función de diferentes parámetros que pueden inhibir el proceso. Entre estos se encuentra el pH, temperatura, tiempo de retención hidráulica (TRH), la carga orgánica, la presión parcial de hidrógeno, composición de la microbiota y concentración de iones metálicos (Bundhoo y Mohee, 2016).

Existen dos los fenómenos que limitan el rendimiento de producción de hidrógeno real en el proceso de fermentación. El primero es la degradación incompleta de los compuestos orgánicos durante la fermentación, llevando a la formación de moléculas pequeñas como el ácido láctico, butírico y propiónico. El segundo el consumo de hidrógeno en cuanto se presenta éste disuelto en el sustrato, por ejemplo, durante la homoacetogénesis (Hoarau et al., 2018).

Entre la microbiota inhibidora de la producción de hidrógeno se encuentran los organismos que utilizan el H_2 para producir otros compuestos, entre estos están los metanógenos hidrogenotróficos y homoacetógenicos, que producen CH_4 mediante la reducción de CO_2 (Huang et al., 2015), los productores de propionato para la producción a partir de glucosa (Luo et al., 2010a, Saady, 2013), las bacterias reductoras de sulfatos para producir sulfuro y las bacterias reductoras de nitratos para producir amoníaco (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009). Las bacterias ácido lácticas, actúan como un supresor de la producción de biohidrógeno mediante la represión de bacterias productoras de hidrógeno a través de la competencia por sustratos (piruvato) o la liberación de toxinas (Noike et al., 2002, Sikora et al., 2013).

El pH es un parámetro de control importante, ya que afecta la actividad de la enzima hidrogenasa que es la principal responsable de la producción de H_2 . Si el pH se encuentra en un rango bajo (4,0 a 4,5) puede cambiar la ruta de producción de H_2 a generación de productos reducidos (lactato) y alcoholes (Zheng y Yu,

2004). En un rango entre 5,0 y 6,0 puede inhibir el crecimiento de microorganismos consumidores de H_2 (Maintinguer et al., 2008).

El tiempo de retención hidráulico está relacionado con la velocidad de crecimiento de la biomasa, el cual es menor en los microorganismos metanogénicos que en los productores de hidrógeno. Cuando se maneja un TRH bajo se incrementa la producción de hidrógeno, ya que ocurre lavado celular de los metanogénicos. (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009).

La carga orgánica, es una variable operacional que puede influir sobre el proceso debido a que los microorganismos productores de hidrógeno, bajo condiciones de sobrecarga orgánica pueden alterar su metabolismo causando la inhibición o cese de la producción de hidrógeno (Foster y Johnstone, 1990, Amorim, 2009).

Al igual que el exceso de carga orgánica, la presión parcial de H_2 puede inhibir la producción, ya que la enzima que permite el proceso (hidrogenasa) se inhibe por las altas concentraciones del hidrogeno gaseoso (Bedoya et al., 2008). Por lo que, en la operación del reactor se busca disminuir la presión parcial del gas para incrementar la producción de H_2 , generalmente se controla con la mezcla rápida, el burbujeo de otro gas inerte, la aplicación de vacío y el uso de membranas permeables (Khanal, 2011).

La temperatura puede afectar significativamente la tasa de degradación de sustrato, la actividad de producción de la enzima hidrogenasa y el metabolismo de los productores de hidrógeno (Mu et al., 2006, Lee et al., 2008, Wang y Wan, 2008b, Guo et al., 2010, Sinha y Pandey, 2011). La temperatura de operación puede incluso modificar las rutas metabólicas, implicando la predominancia de diferentes bacterias a diferentes temperaturas. Se ha encontrado que el incremento de la temperatura dentro de determinados rangos puede incrementar significativamente la producción de hidrógeno, debido a que las altas temperaturas de operación pueden suprimir la actividad de los consumidores de H_2 , así como la de las bacterias metanogénicas y homoacetogénicas (Lay et al., 1999, Oh et al., 2004, Nath y Das, 2004, Sinha y Pandey, 2011, Saady, 2013). Sin embargo, temperaturas extremadamente altas (mayores a $60^{\circ}C$) pueden inhibir a los productores de H_2 por la inactivación de enzimas esenciales para el crecimiento celular, así como la desnaturalización de proteínas de la célula (Lee et al., 2006, Sinha y Pandey, 2011), exceptuando los microorganismos productores de hidrógeno hipertermófilos, tales como *Thermotoga marítima*, y *Pyrococcus furiosus* (Schut y Adams, 2009, Pawar y van Niel, 2013).

Tras una recopilación y análisis de estudios de la fermentación oscura para la generación de biohidrógeno, Elbeshbishy et al. (2017) encontraron que a pesar de determinarse un amplio rango de temperatura ($30-60^{\circ}C$) como óptimo para la fermentación oscura, la mayoría de los estudios sugieren que los rangos de temperatura de operación óptimos para alcanzar una producción de biohidrógeno sin inhibiciones son 37 a $40^{\circ}C$ y 55 a $60^{\circ}C$.

El paso crítico para obtener células vegetativas productoras de hidrógeno de las esporas generadas tras el pretratamiento es la germinación. En consecuencia, es necesario proporcionar las condiciones y nutrientes requeridos para obtener una germinación óptima y rápida. Sólo algunos autores han estudiado el efecto del sustrato inicial y los niveles de pH, sobre la germinación de las esporas de bacterias generadoras de hidrógeno. Algunos estudios apuntan a condiciones óptimas con un pH de 5,5 y una concentración de sustrato que lleve a tener entre 7,5 y 15 g DQO/L para cultivos líquidos (van Ginkel et al., 2001b, van Ginkel et al., 2001a, Fan et al., 2004).

Cuando las células vegetativas son eliminadas tras el pretratamiento, es normal que se genere un periodo de latencia antes de que la generación de H_2 comience. Este periodo de latencia depende de diversos factores, tales como pH, concentración de nutrientes, temperatura, disponibilidad de germinación, entre otros. Los periodos de latencia típicos para la generación de H_2 bajo condiciones mesofílicas es de entre 2 y 4 días (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009).

El nitrógeno es un macronutriente esencial para los microorganismos fermentativos (Morimoto et al., 2004, Lin y Lay, 2004, Li y Fang, 2007, Tyagi et al., 2014), sin embargo, altas concentraciones de amoníaco o elevadas relaciones de carbono-nitrógeno en el sustrato pueden inhibir el proceso de fermentación oscura (Ueno, 2001, Morimoto et al., 2004, Lin y Lay, 2004, Liu y Shen, 2004, Argun et al., 2008, O-Thong et al., 2008, Wang et al., 2009, Rojas et al., 2015). La inhibición por nitrógeno es un gran reto en la generación de H_2 a partir de desechos con alto contenido de hidrógeno, tales como los desechos de animales (1,5 a 4 g N/L) (Guo et al., 2010), ya que el amoníaco puede ser generado por la degradación de compuestos que contienen nitrógeno tales como urea, proteínas y aminoácidos. Altos contenidos de amoníaco pueden inhibir la actividad de los generadores de H_2 , debido a su potencial de interferir con el pH intracelular, al incremento de los requerimientos energéticos de los microorganismos, y a la inhibición de la actividad enzimática responsable de la producción de H_2 (Lay et al., 2005, Bisailon et al., 2006, Salerno et al., 2006).

La forma no ionizada del amoníaco o amoníaco libre (NH_3) es la forma en que el nitrógeno puede penetrar libremente la pared celular e inhibir el metabolismo de las células (Chen et al., 2008). Con base en esto y teniendo en cuenta que la fermentación oscura suele operar a pH ácido, y que en esta condición de pH la mayoría del nitrógeno permanece en forma ionizada como amonio (NH_4^+), el cual es menos tóxico, no debe de presentarse inhibición por contenido de nitrógeno durante la fermentación (Elbeshbishy et al., 2017).

Ya que los microorganismos presentes en la digestión anaerobia, consumen carbono 20 a 30 veces más rápido que el nitrógeno (Kalil, 2008), mantener una apropiada relación C/N en el sustrato es importante para evitar la inhibición del proceso por el contenido de nitrógeno. Se debe tener en cuenta también, que el rendimiento en la producción de hidrógeno decrece rápidamente cuando el contenido de amoníaco sobrepasa los 2 g N/L (González-Gil et al., 2015).

Diferentes métodos de operación fueron evaluados por Albanez et al. (2016) en un medio compuesto de 33% molasas y 67% vinaza de caña de azúcar (6 g DQO/L), concluyendo que con una operación tipo batch se obtuvieron mayores rendimientos en la generación de H_2 (0,759 mol H_2 /mol carbohidrato) que con la operación en flujo continuo (Sydney et al., 2018).

3.2 Pretratamiento del inóculo

El principio del uso de pretratamientos se basa en que algunas bacterias tienen la capacidad de formar esporas como mecanismo de protección, cuando se ven sometidas a condiciones ambientales extremas de temperatura, pH y radiación, donde las esporas formadas sobreviven a diferencia de las bacterias no esporuladoras que son suprimidas (Foster y Johnstone, 1990). Teniendo en cuenta que algunas bacterias productoras de hidrógeno como *Clostridium* sp. son formadoras de esporas, mientras que muchas bacterias consumidoras de hidrógeno no lo son, el pretratamiento favorece a las productoras de hidrógeno y reprime a las consumidoras del mismo (Li y Fang, 2007, Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009).

3.2.1 Métodos de pretratamiento

La mayoría de métodos involucran pretratamiento térmico, químico o la combinación de los dos (Lamaison et al., 2015). Sin embargo, la eficacia de cada método depende de la fuente de inóculo, el substrato y las condiciones operacionales del biorreactor (Mohan, 2009, Luo et al., 2010b).

A raíz de un cierto desacuerdo sobre el mejor método de pretratamiento para enriquecer bacterias productoras de hidrógeno, Wang y Wan (2008a) realizaron un estudio para comparar cinco métodos de pretratamiento relativamente rentables (ácido, base, choque térmico, aireación y cloroformo respectivamente). Los resultados mostraron mejores resultados en el inóculo pretratado por choque térmico (ebullición a 100°C por 15 min) obteniendo una producción máxima de hidrógeno de 221,5 mL/g de glucosa a 35°C y un pH inicial de 7,0.

Ren et al. (2008) evaluaron cuatro métodos de pretratamiento (ácido, alcalinidad, aireación y por choque térmico) aplicado a un cultivo mixto de bacterias colectado de una planta de tratamiento de agua residual municipal. Los resultados mostraron que el pretratamiento con ácido, aireación y choque térmico fueron efectivos para eliminar completamente la actividad metanogénica, a diferencia del pretratamiento alcalino. El máximo rendimiento molar alcanzado fue de 1,96 mol H_2 /mol de glucosa usando la aireación, mientras que el más bajo rendimiento se obtuvo con el inóculo acidificado. Los autores concluyeron que los métodos de pretratamiento dan lugar a la diferencia en las primeras comunidades microbianas, que pueden ser las directamente responsables de los diferentes tipos de fermentación y los rendimientos molares de hidrógeno.

En la Tabla 3.1 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en investigaciones analizadas en el documento de revisión bibliográfica de Wang y Wan (2009) donde se distingue un desacuerdo sobre el método de tratamiento óptimo para la selección de bacterias productoras de H₂. Las diferencias se relacionan con el tipo de inóculo, el método de pretratamiento, las condiciones específicas de cada pretratamiento y la clase de sustrato. De los 6 estudios presentados, 3 de ellos determinaron como pretratamiento óptimo un tratamiento químico.

Tabla 3.1. Comparación de métodos de pretratamiento para la selección de bacterias productoras de H₂ a partir de cultivos mixtos de bacterias

Origen del inóculo	Pre tratamiento		Sustrato	Rendimiento molar máximo	Referencia
	estudiado	óptimo			
Digestor de lodos	Ácido, base, choque térmico, aireación y cloroformo	Choque térmico	Glucosa	1,8 mol/mol glucosa	Wang y Wan (2008a)
Digestor de lodos tratamiento de agua residual	Choque térmico, aireación, ácido, base, 2bromoetanosulfonato ácido y iodopropano	Base	Sacarosa	6,12 mol/mol sacarosa	Zhu y Béland (2006)
Lodo anaerobio	Sodio 2bromoetanosulfonato, ácido, choque térmico y sus cuatro combinaciones	Sodio 2bromoetano sulfonato	Agua residual de lácteos	0,0317 mol/g DQO	Mohan (2009)
Lodo anaerobio	Ácido, base y choque térmico	Choque térmico	Glucosa	2 mol/mol-glucosa	Mu et al. (2007)
Estiércol de ganado	Congelación y descongelación, ácido, choque térmico, sodio 2bromoetanosulfonato	Ácido	Glucosa	1,0 mol/mol-glucosa	Cheong y Hansen (2006)
Gránulos metanogénico	Ácido, choque térmico y cloroformo	Cloroformo	Glucosa	1,2 mol/mol-glucosa	Hu y Chen (2007)

Fuente: Wang y Wan (2009)

Wong et al. (2014) compararon la efectividad del tratamiento ácido y básico en varios estudios, concluyendo que el rendimiento en la producción de hidrógeno es 1,6 veces mayor al utilizar tratamiento ácido que al utilizar pretratamiento básico sobre un inóculo.

Los pretratamientos más comúnmente estudiados y comparados con otras tecnologías son el pretratamiento ácido y térmico, siendo estos dos los más efectivos en el pretratamiento de inóculos y sustratos (Bundhoo et al., 2015). No se puede afirmar que el pretratamiento ácido o térmico sea el más efectivo debido a la interferencia de factores como las condiciones de pretratamiento, inóculo y

sustrato utilizados, que implican una gran variabilidad en las condiciones experimentales (Kan, 2013, Singh y Wahid, 2015).

3.2.2 Pretratamiento químico

Los tratamientos ácidos y alcalinos son ampliamente utilizados para incrementar la presencia de bacterias productoras de hidrógeno e inhibir el desarrollo de los consumidores de hidrógeno, explotando su sensibilidad a los cambios de pH debido a su condición de no generar esporas. Bajo un ambiente extremadamente crítico (con altos o bajos valores de pH) los microorganismos metanogénicos que no generan esporas sufren la ruptura de su pared celular, mientras las principales bacterias productoras de hidrógeno (*Clostridium spp.* y *Bacillus spp.*) son capaces de esporular y sobrevivir. Los ácidos comúnmente usados son HCl, HClO₄, H₂SO₄ y HNO₃, para el tratamiento alcalino el NaOH y KOH han sido empleados ampliamente (Wong et al., 2014).

Las capas interiores de los cultivos granulares están aisladas y protegidas, siendo menos susceptibles a ataques por inhibidores químicos tales como ácidos y alcalinizantes. En los estudios realizados por Hu y Chen (2007) y Pendyala et al. (2012), los cultivos granulares tratados con ácido o alcalinizantes mostraron actividad metanogénica; sin embargo, dicha actividad no se detectó en los cultivos floculentos tratados bajo las mismas condiciones, implicando mayor efectividad en el proceso de selección de la microbiota en los casos en los que se tiene cultivo floculento. Pendyala et al. (2012) encontraron también una cantidad mayor de microorganismos consumidores de hidrógeno en el cultivo granular que en el floculento.

En la Tabla 3.2 se observa que el tiempo de exposición común entre los estudios es de 24 horas. Para el pretratamiento ácido se lleva el inóculo hasta un valor de pH de 3 UN generalmente, y para el básico a 12 UN. Chang et al. (2011) reportaron que el pretratamiento alcalino fue más efectivo que el ácido, cuando se utilizó un lodo de AR urbana con glucosa como sustrato.

Las condiciones óptimas para el pretratamiento pueden variar entre los diferentes inóculos, debido a las características de las diferentes poblaciones microbianas. Además, cuando los sustratos con baja degradabilidad tales como los residuos lignocelulosos son usados como sustratos, un pretratamiento intensivo podría destruir parcialmente las bacterias hidrolíticas, implicando una disminución en el rendimiento de producción de hidrógeno (Rafieenia et al., 2017).

Los resultados obtenidos por Chang et al. (2011) mostraron que el pretratamiento que permitió obtener el mejor rendimiento en la producción de hidrógeno fue el pretratamiento ácido, en dicho estudio se utilizaron tratamientos ácido, básico, golpe de calor, aireación, cloroformo, control y 2-bromoetanosulfonato.

Tabla 3.2. Resultados obtenidos tras la aplicación de pretratamientos químicos

Inóculo	Sustrato	Método de pretratamiento	Rendimiento de producción de H ₂	Referencias
Lodos activados	Glucosa	Ácido (HCl 1M, pH 3, 24 h)	$\Delta Y = +280\%$	Chang et al. (2011)
-	Harina de maíz hidrolizada	Ácido (pH 3)	$\Delta Y = +18\%$	Zhang et al. (2011)
Lodo anaerobio	Residuos de vinagre	Ácido (HCl, pH 3,5, 24 h) Alcalino (NaOH, pH 12, 24 h)	55,4 g ⁻¹ SSV 41,5 mL g ⁻¹ SSV	Wang et al. (2015)
Lodo	Glucosa	Alcalino (KOH, pH 12, 24 h)	Control: 0,14 mol/mol glucosa Lodo pretratado: 0,83 mol H ₂ /mol glucosa	Pendyala et al. (2012)
Lodo activado	Glucosa	Alcalino (NaOH, 24h)	$\Delta Y = +250\%$	Chang et al. (2011)
Lodo anaerobio	Molino de aceite de palma	Ácido (HCl 6N, pH 3, 24 h)	$\Delta Y = +166\%$	Mohammadi et al. (2011)
		Alcalino (6 N NaOH, pH 12, 24 h)	$\Delta Y = +208\%$	
AR urbana	Glucosa	Ácido (HCl, pH 3, 24 h)	$\Delta Y = -28\%$	Hu y Chen (2007)

ΔY : Incremento del rendimiento de producción de H₂ respecto al control

Fuente: Adaptado de Rafieenia et al. (2017)

En el estudio realizado por Lee et al. (2009) se probaron tres ácidos fuertes (HCl, HNO₃, y H₂SO₄) para evaluar cuál sería el más apropiado para enriquecer la población de bacterias productoras de hidrógeno e incrementar la producción de H₂. No se observó una producción de H₂ significativa durante las 12 h iniciales, indicando que es a partir de este punto que las bacterias productoras de hidrógeno se tornan activas. No se observó producción de metano durante la operación del reactor, implicando una inhibición severa de los organismos metanogénicos por parte de los pretratamientos ácidos. El efecto del pH durante el pretratamiento con HCl sobre la producción de H₂ fue determinado para valores de pH 2, 3, 4 y 5. A medida que el pH aplicado durante el tratamiento disminuyó, la producción de H₂ incrementó. Los autores concluyen que los microorganismos de la especie clostridium productores de H₂ pueden ser enriquecidos de forma selectiva implementando el pretratamiento ácido de HCl.

Lamaison et al. (2015) Investigaron como el pretratamiento por calor y el pretratamiento ácido, afectaron la producción termofílica de hidrógeno de un cultivo mixto proveniente de una planta de tratamiento de agua residual que trata

vinaza de caña de azúcar. Los lodos tratados con calor (80°C por 15 min) ó ácido (pH 3 por 24 h) fueron empleados para inocular reactores batch que fueron evaluados durante 36 días. Los resultados mostraron que los reactores con el inóculo sin pretratar y pretratado con calor toman 7 días para estabilizarse, mientras que el reactor del pretratamiento químico toma 12 días. La producción de hidrógeno obtenida para el pretratamiento ácido fue cercana a 9,5 mmol(L·d)⁻¹ y mayor a la obtenida en el reactor control (1.9 mmol(L·d)⁻¹). Los autores indican que, a largo plazo, el tratamiento ácido favorece el desarrollo de una población microbiana compuesta principalmente por Clostridiaceae, la cual es capaz de disminuir la concentración de lactato en el reactor, siendo el lactato normalmente relacionado con la inhibición de la producción de H₂.

Diversos autores indican que al finalizar el pre tratamiento químico es necesario realizar un ajuste del pH hasta que llegue a un valor en el cual se favorezca la fermentación y la producción de hidrógeno, generalmente se realiza con 1N NaOH (Chen et al., 2002, Wang y Wan, 2008a, Liu y Cheng, 2010).

HCl

El ácido clorhídrico es un gas incoloro, de un olor muy fuerte y excesivamente corrosivo; a temperatura ambiente emite vapores blancos y corrosivos. Es denominado un ácido fuerte debido a que en contacto con el agua se disocia completamente Ecuación 3.5.



Las células bacterianas en contacto con cloro liberan ácidos nucleicos, proteínas y potasio, por lo que las funciones de la membrana, tales como la respiración y el transporte activo, son más afectadas por el cloro que los procesos citoplasmáticos. El cloro reacciona con la pared celular bacteriana y causa alteraciones fisicoquímicas, por lo que destruye la barrera protectora de la célula y da lugar a la muerte del microorganismo (Macizo, 2007).

El cloro reacciona con la materia orgánica e inorgánica presente en el agua, formando subproductos como cloraminas, diclorometilaminas, fenoles clorados y trihalometanos (USON, 2013).

El ácido clorhídrico es uno de los reactivos más utilizados para realizar desinfección en agua potable y pretratamiento en agua residual (Macizo, 2007, Rorke y Gueguim Kana, 2016). También, ha sido ampliamente utilizado dentro del campo de la investigación para la producción de biohidrógeno. Este reactivo ha sido aplicado como pretratamiento para inóculos (Tabla 3.3) con el fin de enriquecerlos con microorganismos hidrogenogénicos. Dentro de los estudios presentados se observa una tendencia de condición de pH y tiempo muy similares que se encuentran alrededor del pH 3 y las 24 horas; sin embargo, se presentan diferentes rendimientos lo que es ocasionado por el tipo de inóculo, sustrato, concentración del ácido y otras variables del estudio.

Tabla 3.3 Pretratamiento de inóculos con HCl para producción de hidrógeno

Inóculo	Sustrato	Concentración, pH, tiempo	Rendimiento de producción de H ₂	Referencias
Lodos activados	Glucosa	1M, pH 3, 24 h	$\Delta Y = +280\%$	Chang et al. (2011)
Lodo anaerobio	Residuos de vinagre	6 M, pH 3,5, 24 h	55,4 ml g ⁻¹ SSV	Wang et al. (2015)
Lodo anaerobio	Molino de aceite de palma	6N, pH 3, 24 h	$\Delta Y = +166\%$	Mohammadi et al. (2011)
AR urbana	Glucosa	0,1 N, pH 3, 24 h	$\Delta Y = -28\%$	Hu y Chen (2007)
Lodo anaerobio	AR extracción del almidón de yuca	1N, pH 3, 24 h	1,1 mol H ₂ mol ⁻¹ Glucosa	Barrios (2015)
Lodo digestado	Glucosa	35%, pH 2, 24 h	$\Delta Y = +320\%$	Lee et al. (2009)
Lodo de UASB	Glucosa	5 M, pH 3, 24 h	2,21 mol H ₂ mol ⁻¹ Glucosa	Lamaison et al. (2015)
Lodo anaerobio	Lodo activado de industria cervecera	0,5%(w/v), pH1, 6 h	$\Delta Y = +240\%$	Assawamongkholsiri et al. (2013)

ΔY : Incremento del rendimiento de producción de H₂ respecto al control

Lamaison et al. (2015) hicieron una prueba preliminar evaluando dos tiempos para el pretratamiento ácido, 12 y 24 horas y finalmente, se realizó el ensayo con 24 horas. Lee et al. (2009) realizaron su estudio con pH de 2, 3, 4 y 5, donde el mejor rendimiento se consiguió con pH 2. En el estudio de Assawamongkholsiri et al. (2013) el tiempo de tratamiento de 6 horas fue considerado el mejor, teniendo en cuenta que se necesita un tiempo de tratamiento más corto para una aplicación económica y práctica.

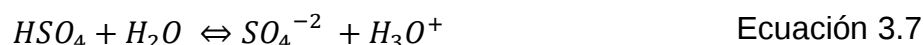
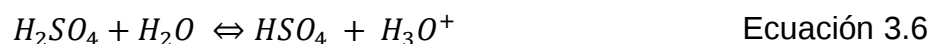
Esto demuestra que, aunque generalmente se utiliza un pretratamiento ácido de pH 3 y 24 horas, todavía hay espacio para explorar diferentes condiciones de pretratamiento con HCl que puedan generar un mejor rendimiento.

Adicionalmente, el ácido clorhídrico ha sido utilizado en el pretratamiento de sustratos para favorecer la producción de hidrógeno, entre estos se encuentran: residuos de trigo, estiércol de vaca, lodos activados, residuos de comida, AR

urbana y hojas de álamo (Fan et al., 2006, Xing et al., 2010, Rafieenia et al., 2017).

H₂SO₄

Es un líquido, incoloro, viscoso, un ácido mineral fuerte, oxidante, agente corrosivo y deshidratante. Se disocia en agua de acuerdo con dos equilibrios, los cuales se representan en las ecuaciones 3.6 y 3.7.



Las reacciones del ácido sulfúrico concentrado en el área de los compuestos orgánicos, están muy influenciadas por las propiedades oxidantes e higroscópicas de éste; debido a estas características, las reacciones de carbonización de carbohidratos y de condensación orgánica presentan mejor desempeño en su presencia (IDEAM, 2011). Actúa como bactericida alterando la permeabilidad de la célula y su actividad es proporcional al grado de disociación (Franklin y Snow, 1989).

Este reactivo es uno de los más utilizados para realizar tratamientos que favorecen la producción de biohidrógeno (Rafieenia et al., 2017). El ácido sulfúrico ha sido estudiado principalmente como pretratamiento para sustratos, debido a su efecto catalizador. Cuando se utilizan sustratos provenientes de la agroindustria generalmente son materiales lignocelulósicos, que contienen azúcares polimerizados de celulosa, hemicelulosa y lignina que pueden liberarse por hidrólisis y posteriormente, fermentarse (Parajó et al., 1997). Como este es un método bien conocido y efectivo, el ácido sulfúrico es diluido y utilizado para catalizar la degradación de la hemicelulosa (Baek y Kwon, 2007).

En estudios sobre la producción de hidrógeno, autores como Fangkum y Reungsang (2011) utilizaron diferentes concentraciones de H₂SO₄ (0,25 a 5% v/v) para pretratar bagazo de caña de azúcar, reportándose como la concentración óptima de 1% (v/v). Pan et al. (2011) investigaron el pretratamiento ácido del tallo de maíz con H₂SO₄ (1,5% v/v), donde se encontró una producción de H₂ máxima de 103,3 mL.g SV⁻¹ con un incremento de 368% en relación al control. El ácido sulfúrico también fue empleado en la producción de biohidrógeno, para pretratar sustratos como el fruto de palma de aceite por Chong et al. (2013) y salvado de arroz por Azman et al. (2016) con el fin de incrementar la biodisponibilidad de carbohidratos y de esta manera la generación de H₂.

En el pretratamiento de inóculos para la producción de hidrógeno, el H₂SO₄ ha sido poco estudiado. Sin embargo, Lee et al. (2009) realizaron un estudio comparando diferentes ácidos fuertes (HCl, H₂SO₄ y HNO₃), de los cuales el H₂SO₄ fue el que generó mayor rendimiento (Figura 3.4). En este estudio se

realizó el pretratamiento de lodo anaerobio a un pH de 2 por 24 horas y previo al proceso de fermentación el pH fue ajustado a 5,5.

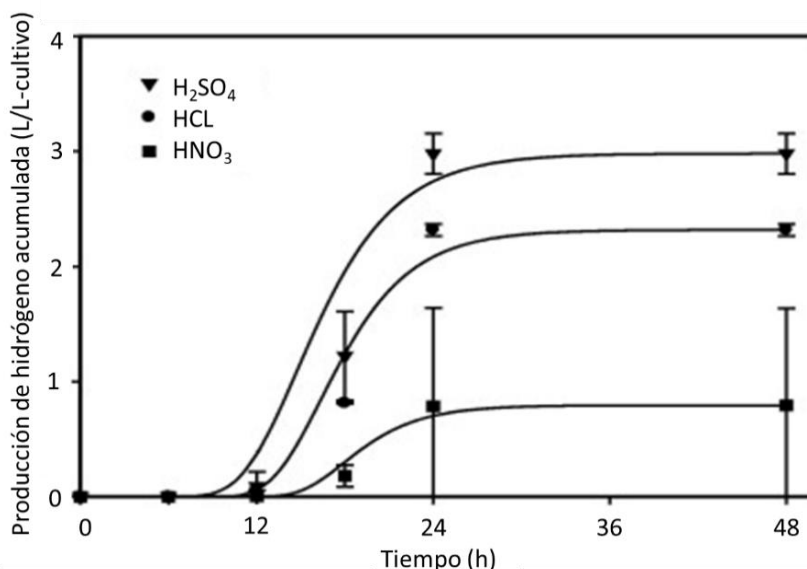


Figura 3.4 Producción acumulada de H₂ a partir de lodo anaerobio pretratado con diferentes ácidos fuertes a pH2. (Barras de error indican la desviación estándar)

Fuente: Lee et al. (2009)

Teniendo en cuenta lo anterior, es necesario realizar más estudios para ampliar el conocimiento sobre el comportamiento de H₂SO₄ como pretratamiento en inóculos en la producción de hidrógeno.

3.3 Vinaza

La vinaza es un subproducto del proceso de destilación y rectificación que hace parte de la producción de etanol, contiene principalmente melazas y materia orgánica, como se muestra en la Figura 3.5. Es producida en varios países a partir de diversas materias primas: caña de azúcar en Suramérica (Hannon y Trenkle, 1990) remolacha, vino y frutas en Europa, y maíz y tequila en América del Norte (Giachini y Ferraz, 2009, España et al., 2011).

Según la (FAO, 2019) para el 2017, Colombia estaba entre los principales países productores de caña de azúcar, con un área de cultivo equivalente a 0,40 millones de hectáreas, producción anual de 35 millones de toneladas por año y una cosecha promedio de 87,17 toneladas por hectárea.

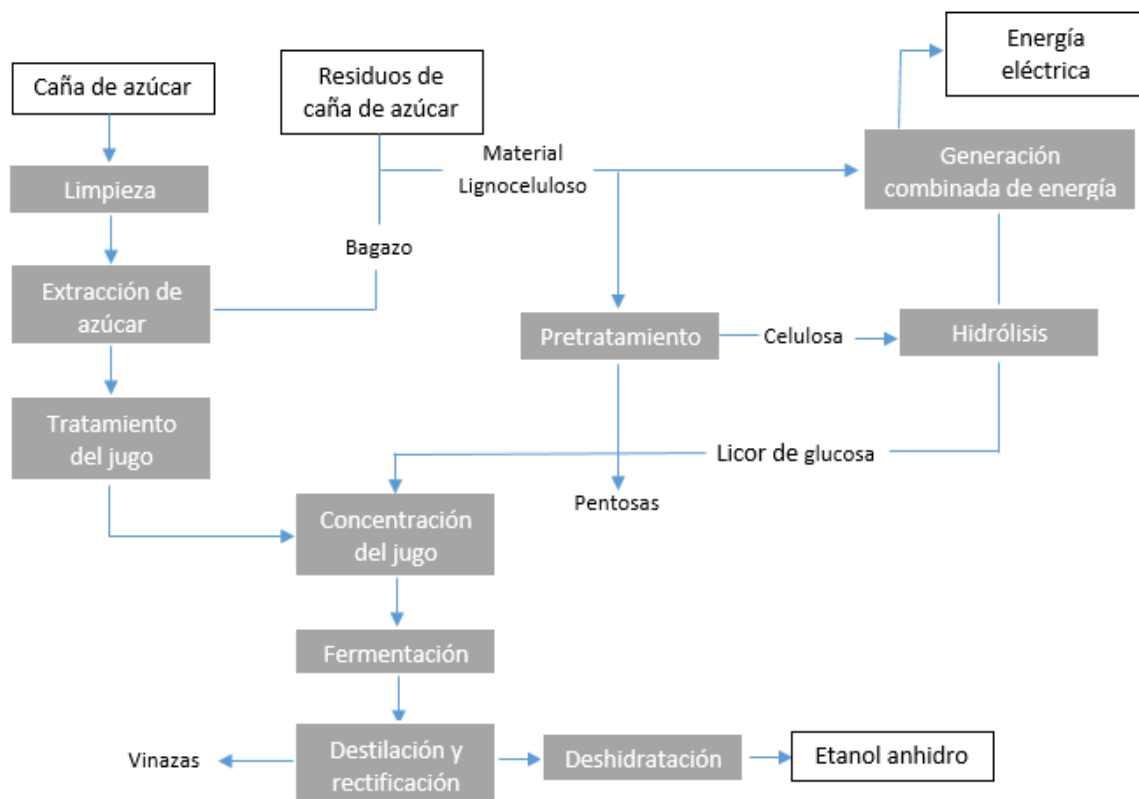


Figura 3.5 Diagrama de flujo de los procesos de producción de etanol, primera y segunda generación integrados

Fuente: Moraes et al. (2015)

3.3.1 Caracterización

Las propiedades fisicoquímicas de la vinaza están en función de la materia prima utilizada para su producción, los equipos de destilación y otras variables más específicas (Christofolletti et al., 2013), en la Tabla 3.4 se presentan los valores típicos para cuatro diferentes materias primas.

3.3.2 Impactos ambientales y disposición final

El mayor impacto ambiental relacionado con la vinaza está ligado al alto volumen generado por litro de etanol producido, que tiene una relación entre 10 y 15 L de vinaza (según el equipo de destilación) por 1 L de etanol (Christofolletti et al., 2013). Los altos volúmenes generados hacen que su transporte a través de tuberías y bombeo, implique un elevado costo económico, por lo que en algunas empresas se opta por utilizar canales excavados abiertos. La exposición de la vinaza al aire permitirá la volatilización de moléculas que pueden contribuir de forma negativa al calentamiento global, por la emisión de gases de efecto invernadero, el uso de canales excavados abre la posibilidad a la percolación de la vinaza hacia el suelo y agua subterránea, causando salinización del suelo,

lixiviación de metales y sulfato, así como la generación de malos olores y la posible atracción de insectos (Moraes et al., 2015).

Tabla 3.4. Composición química de la vinaza proveniente de diferentes materias primas

Parámetros	Vinaza			
	Caña de azúcar	Uva (Vino)	Remolacha	Sorgo dulce
pH	3,9	2,9	5,1	4,5
DBO	5.046	18.900	78.300	46
DQO	13.380	nd	nd	nd
Potasio	2.056	118–800	10.000 - 10.030	nd
Sodio	50,2	nd	3,79	nd
Sulfato	710	120	0,62	nd
Calcio	719	nd	0,71	nd
Magnesio	237	nd	1,23	nd
Fósforo total	190	83	91	1.990
Dureza	2.493	nd	nd	nd
As	nd	nd	nd	nd
Ba	0,41	nd	nd	nd
Cd	nd	0,05–0,08	<1*	nd
Cr	0,04	nd	nd	nd
Cu	0,35	0,2–3,26	2,1–5*	37
Hg	0,0019	nd	nd	nd
Mo	0,008	nd	nd	nd
Ni	0,03	nd	nd	nd
Pb	nd	0,55–1,34	<5*	nd
Se	nd	nd	nd	nd
Zn	1,66	nd	nd	nd

Todos los valores, excepto el pH, están expresados en mg L⁻¹; (*) unidades mg kg⁻¹; (nd): dato no disponible

Fuente: Christofolletti et al. (2013)

Por décadas, el principal destino para la vinaza ha sido su aplicación para la fertilización de los cultivos de caña, práctica conocida como "fertirrigation". Sin embargo, la legislación ambiental que rige a cada país tiene implicaciones directas sobre los vertimientos hechos por la industria, determinando la calidad de agua que puede ser vertida en suelos y cuerpos de agua. Además, el uso de la vinaza como fertilizante cuenta con limitantes respecto a los volúmenes y la calidad

aplicada, siendo necesario el control del volumen máximo a aplicar teniendo en cuenta la capacidad de infiltración del suelo y, la cercanía de cuerpos de agua subterránea que puedan ser contaminados (Moraes et al., 2015).

3.3.3 Vinaza en la producción de hidrógeno

La producción de hidrógeno utilizando vinaza tiene varios problemas de toxicidad relacionados con el contenido de potasio, sulfato (Searmsirimongkol et al., 2011), compuestos fenólicos (Tai et al., 2010), y melanoidinas (Íñiguez-Covarrubias y Peraza-Luna, 2007). Este problema puede estar relacionado con el uso de altas cargas orgánicas. Según Buitrón y Carvajal (2010) la cantidad de hidrógeno producida se vio afectada por la concentración inicial de sustrato. Debido a esto, es importante evaluar el efecto de dicha concentración sobre la producción de hidrogeno (Lazaro et al., 2014).

Sydney et al. (2018) presentan diferentes estudios enfocados en la generación de hidrógeno a partir de vinaza de caña de azúcar (Tabla 3.5), donde se resalta que no se presenta una diferencia estadística utilizando molasas de caña de azúcar, jugo de caña de azúcar y sacarosa.

En el estudio realizado por Lazaro et al. (2014) se usó un consorcio mesofílico de un digestor anaerobio que resultó en un rendimiento de hidrógeno máximo de 0,826 mol H₂/mol glucosa (considerando 1g de glucosa = 1,07 g DQO) con vinaza diluida al 20% y sin una fuente de carbono orgánico suplementaria. El bajo rendimiento en la generación de hidrógeno alcanzado es una consecuencia del bajo contenido de azúcares fermentables en la vinaza, que se refleja en la necesidad de implementar suplementación de carbono orgánico.

dos Reis et al. (2015) alcanzaron un incremento de diez veces la producción de hidrógeno al suplementar la vinaza con glucosa. Se alcanzó un rendimiento máximo de 3,54 mol H₂/mol glucosa utilizando una mezcla de 25% vinaza y 75% glucosa en un reactor UASB, en donde las bacterias de *Prevotellaceae* (55%) y *Megasphaera* (28%) predominaron. En el mismo estudio, la especie *Clostridiaceae* compuso el 3% del consorcio, el 7% fue compuesto por bacterias del filo *Bacteroidetes* y el 7% restante estuvo comprendido por bacterias pertenecientes al filo *Firmicutes*.

Entre las ventajas del uso de la vinaza en la producción de hidrógeno está su capacidad de mitigar el impacto que tiene esta sobre el ambiente. Además, el medio líquido obtenido tras la generación de hidrógeno está compuesto principalmente de ácidos orgánicos, que pueden ser fácilmente tratados en un posterior reactor metanogénico. La posibilidad de reducir energía al mismo tiempo que se mitiga el impacto ambiental, puede estimular la adopción de las plantas de tratamiento implementando biotecnología anaerobia (Fernandes et al., 2010).

Tabla 3.5. Rendimientos en la generación de hidrógeno a partir del procesamiento de caña de azúcar alcanzados en diferentes estudios

Fuente del inóculo	Modo de operación	Mol H ₂ /mol glucosa	Medio	Referencia
Reactor UASB de matadero de aves de corral	batch	0,83	vinaza de caña de azúcar diluida al 20%	Lazaro et al. (2014)
Reactor anaerobio de matadero de aves de corral	batch	0,76	33% molasas + 67% vinaza de caña de azúcar	Albanez et al. (2016)
Fermentación de agua residual natural	Reactor continuo de lecho compacto	1,40	100% vinaza de caña de azúcar	Djalma et al. (2014)
Lodo anaerobio de tratamiento de abono porcino	Reactor continuo de lecho suspendido	3,54	25% vinaza de caña de azúcar + 75% glucosa	dos Reis et al. (2015)
Heces de murciélago de fruta	batch	2,10	100% vinaza de caña de azúcar + 10 g/L sucrosa	Sydney et al. (2018)
Agua residual de granja lechera	batch	1,50–1,60	100% vinaza de caña de azúcar + 10 g/L fuente de carbono orgánico ^a	Sydney et al. (2018)
Suelo usado en cultivo de caña de azúcar	batch	1,15	100% vinaza de caña de azúcar + 10 g/L sacarosa	Sydney et al. (2018)
Suelo usado en cultivo de caña de azúcar	batch	0,97	100% vinaza de caña de azúcar + 10 g/L equivalente en sacarosa de jugo de caña de azúcar	Sydney et al. (2018)

Fuente: Sydney et al. (2018)

4 MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Ambiental adscrito al Área de Ingeniería Sanitaria y Ambiental de la Universidad del Valle.

En este estudio se realizaron ensayos experimentales con el fin de evaluar la influencia del pretratamiento sobre la producción de biogás. Para tal efecto, el estudio se llevó a cabo en 3 etapas. En la primera etapa se realizaron ensayos preliminares para determinar la concentración del sustrato, concentración de reactivos a utilizar, y los periodos de monitoreo. La segunda, consistió en el pretratamiento químico, con el fin de eliminar los microorganismos metanogénicos. Finalizado el pretratamiento se realizó la tercera etapa, que involucró la evaluación del PBH, donde se puso en contacto el lodo resultante de cada pretratamiento con el sustrato, para ser monitoreada la producción de hidrógeno mediante la presión de biogás.

4.1 Sustrato e inóculo

Se empleó como sustrato la vinaza generada tras el proceso de producción de etanol proveniente de un ingenio azucarero. La caracterización inicial del sustrato se muestra en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Caracterización de la vinaza diluida al 15%

Parámetro	Valor	Unidad
DQO	53.133,3	mg/L
Carbohidratos totales	12.259	mg/L
AGV's	8.797,8	mg/L
Alcalinidad total	235,5	mg/L
pH	5,32	UND
Orto-Fosfato	50,00	mg/L
Nitrógeno Amoniacal Total (NAT)	19,25	mg/L

Como inóculo se seleccionó un lodo granular metanogénico procedente del reactor UASB de la planta de tratamiento de agua residual del sector cárnico, en la Central de Abastecimiento del Valle de Cauca S.A (CAVASA) ubicada en el kilómetro 11 en la vía Cali – Candelaria.

Este inóculo frente a sustratos simples como Acetato, Butirato y H_2/CO_2 genera valores de AME 0,57, 0,37 y 0,15 g DQO- CH_4 . (g SVTd)⁻¹) respectivamente (Guyot, 1993, Ramirez, 1998). Para una mezcla de ácidos grasos volátiles (acetato, butirato y propionato) se han reportado valores de AME de 0,0024 (mol CH_4 (g DQO)⁻¹) (Hurtado y Muñoz, 2014), 11,04 mL CH_4 .(g SV.d)⁻¹ (Barrios, 2015) y 0,26 gDQO- CH_4 (gSVT.d)⁻¹ (Yela y Peña, 2015), los cuales son suficientes para catalogarlo como un lodo de buena calidad para un proceso anaerobio. Respecto

a su potencial como inóculo para la fermentación oscura, Hurtado y Muñoz (2014), Barrios (2015) y Yela y Peña (2015), mostraron que este inóculo después de someterse a un pretratamiento es adecuado, tanto para la fermentación oscura de glucosa como para la fermentación oscura de agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca, reportando valores de PBH de 0,52 (máximo 1,56) mol H₂.(mol glucosa)⁻¹.

4.2 Adaptación del inóculo

Con el fin de obtener un inóculo enriquecido con microorganismos que degraden los compuestos presentes en la vinaza, se realizó una adaptación progresiva del inóculo al sustrato en estudio. Para ello, se realizó un proceso similar al descrito por Yela y Peña (2015) en el cual una porción del inóculo se pone en contacto con una mezcla de sustratos, compuesta inicialmente por una alta proporción de agua residual proveniente de la industria de sacrificio de ganado (S1) y una baja proporción de vinaza (S2). Luego, se reemplazó la mezcla de sustratos por otra en la cual la proporción de S1 disminuyó y se incrementó S2, esta operación se repitió hasta que S2 representó el 100% del sustrato. Para reemplazar la mezcla de sustratos y cambiar las proporciones se tuvo en cuenta la reducción de DQO, aceptando reducciones mayores al 60% como un buen indicativo de que los microorganismos estaban degradando la mezcla de sustratos.

La proporción volumétrica entre inóculo/sustrato fue de 60/40. Se dispuso para la adaptación 1,2 L de inóculo, los cuales representan el 60% y, el otro 40% correspondió a 0,8 L de mezcla de sustratos, esta mezcla se realizó según las proporciones establecidas en la Tabla 4.2. En total fueron adaptados 5,4 L de lodo.

Tabla 4.2 Relación volumétrica para mezcla de sustratos

Relación	Relación volumétrica de los sustratos (%)
1	100 / 0
2	80 / 20
3	60 / 40
4	40 / 60
5	20 / 80
6	0 / 100

S1: agua residual proveniente de la industria de sacrificio de ganado

S2: vinaza

Como se muestra en la Figura 4.1, la adaptación fue llevada a cabo en un reactor cerrado herméticamente para garantizar condiciones anaerobias, el cual se localizó dentro de una nevera de icopor, con el objetivo de proporcionar oscuridad y regulación de temperatura.

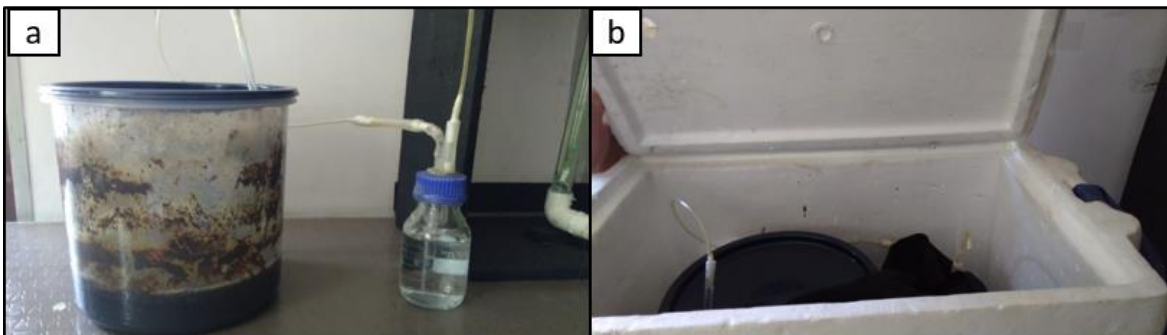


Figura 4.1 Reactor de aclimatación. a) Configuración del reactor de aclimatación, b) Control de temperatura y luz en el reactor de aclimatación

En la Tabla 4.3 se presentan las características del inóculo adaptado.

Tabla 4.3. Características del inóculo adaptado

Parámetro	Valor
Sólidos totales (mg/L)	107.285
Sólidos volátiles (mg/L)	73.645
pH	7,6

4.3 Unidad experimental

La unidad experimental consistió en un reactor de flujo discontinuo, color ámbar y volumen útil de 400 mL, se le adicionó un imán y un capuchón con tres perlas de NaOH para incentivar la captura del CO₂ generado en el biogás, favoreciendo así, que la presión ejercida por el biogás dentro del reactor sea casi en su totalidad presión de hidrógeno. El reactor fue sellado con un tapón de caucho y un agrafo metálico, para garantizar la hermeticidad y evitar el escape del biogás y la entrada de oxígeno. Para asegurar el efectivo contacto entre el sustrato y la biomasa dentro del reactor, se dispuso de un agitador magnético y un imán. La Figura 4.2 muestra la unidad experimental empleada.

4.4 Pretratamiento del inóculo

Para enriquecer el inóculo con microorganismos productores de hidrógeno e inhibir los microorganismos consumidores de hidrógeno, se requiere realizar un pretratamiento al inóculo, que para este estudio se seleccionó el pretratamiento ácido.

Como la efectividad del pretratamiento químico depende especialmente de tres factores: **pH aplicado, tipo de reactivo químico y tiempo de exposición del químico para bajar el pH**, se realizó la evaluación del efecto de estos tres factores en la producción de hidrógeno.

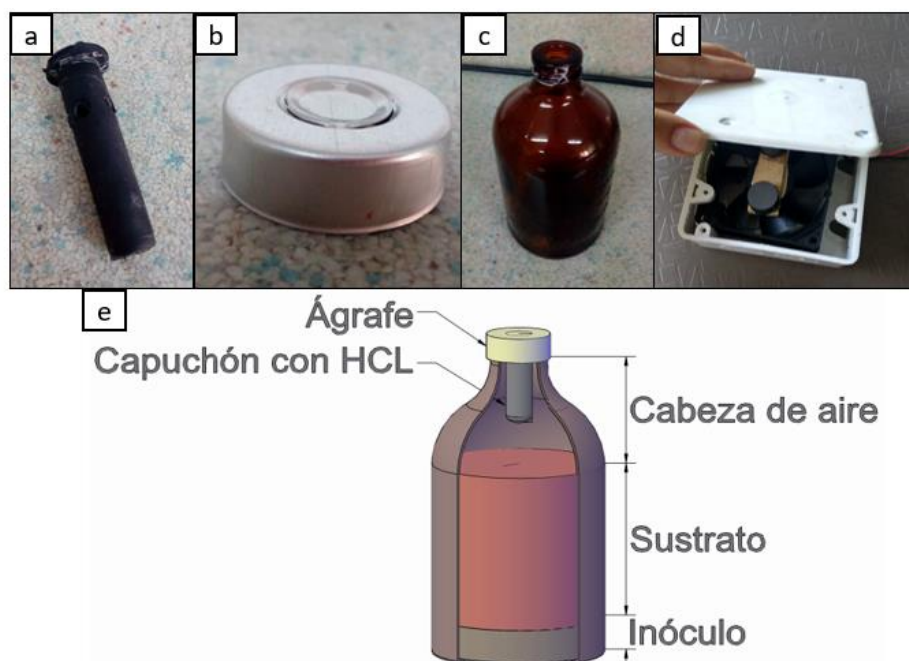


Figura 4.2. Unidad experimental y representación gráfica. a) Capuchón, b) Agrafe, c) Frasco de vidrio, d) Agitador, e) Esquema de unidad experimental

Se seleccionaron dos tipos de reactivos químicos: El primero es el ácido clorhídrico (HCl), el cual ha sido ampliamente estudiado como pretratamiento para la producción de hidrógeno tanto para lodos activados como para lodos anaerobios (Rafieenia et al., 2017). En el estudio realizado por Cui y Shen (2012) se establece una concentración óptima de 1 N. Sin embargo, en este estudio se optó por una concentración de 8 N para disminuir la dilución del inóculo durante el pretratamiento. En segundo lugar, se seleccionó un ácido poco estudiado como lo es el ácido sulfúrico (H_2SO_4). Aunque Lee et al. (2009) en su estudio utilizan una concentración del 95%, se empleó una concentración de 8 N al igual que el HCl, con la intención de que los dos ácidos tuviesen la misma cantidad de equivalentes, es decir, que al entrar en contacto con el lodo los dos reactivos aporten la misma cantidad de H^+ por mol y así poder evaluarlos equitativamente. El reactivo fue adicionado hasta llegar al valor de pH deseado.

Los tiempos de exposición evaluados (6 h y 24 h) fueron definidos teniendo en cuenta lo reportado por Assawamongkholisiri et al. (2013), lo cual se refiere a la producción acumulativa máxima de hidrógeno. Por lo tanto, una vez el inóculo se encontró en el pH deseado, este se sometió al pretratamiento durante 6 horas para un caso y 24 horas para el otro. Respecto al pH, este ha sido establecido en un valor óptimo de 3 por autores como Hu y Chen (2007), Mohammadi et al. (2011) y Chang et al. (2011), sin embargo Lee et al. (2009) encontraron que un pretratamiento a pH 2 puede tener mayor efectividad. Con base en lo anterior el pH se evaluó con los valores de 2 y 3.

El pretratamiento del inoculo se realizó teniendo en cuenta la metodología presentada por Barrios (2015) que consistió en tomar inicialmente, cuatro muestras de igual volumen de inóculo adaptado. A dos de estas muestras se les adicionó HCl (8 N) llevando una a un pH de 2 y otra a un pH de 3; a las otras dos muestras se les adicionó H₂SO₄ (8 N) llevando igualmente, una a pH 2 y la otra a pH 3. Después de 18 horas de iniciado el pretratamiento, se tomaron otras cuatro muestras de igual volumen de inóculo adaptado, y se realizó el mismo procedimiento explicado anteriormente. Al cabo de 6 horas se obtuvieron cuatro muestras de lodo con un tiempo de pretratamiento de 24 horas y otras cuatro con un tiempo de 6 horas. A cada una de las muestras pretratadas se les denominó “Tratamientos” (T). En la Tabla 4.4 se presentan el ácido, pH y tiempo de exposición correspondientes a cada pretratamiento implementado.

Tabla 4.4. Tratamiento del ensayo

Nombre Tratamiento	Ácido	pH	Tiempo
T1	HCl	2	24
T2	HCl	3	24
T3	H ₂ SO ₄	2	24
T4	H ₂ SO ₄	3	24
T5	HCl	2	6
T6	HCl	3	6
T7	H ₂ SO ₄	2	6
T8	H ₂ SO ₄	3	6

Una vez concluido el periodo de pretratamiento, el pH del inoculo se ajustó a un valor de 5,4, el cual se encuentra dentro del rango recomendado por Barrios (2015) para producción fermentativa de hidrógeno, a través de la adición de un buffer alcalinizante.

De acuerdo con Chernicharo (2007) no todos los alcalinizantes proporcionan alcalinidad bicarbonática de la misma forma, por ejemplo el NaOH solo proporciona alcalinidad cuando reacciona con el gas carbónico, mientras que el NaHCO₃ y Na₂HPO₄ lo hacen directamente. Según las experiencias de Pérez (2007) y Barrios (2015), el tipo de alcalinizante es una de las variables más influyentes, existen productos como el bicarbonato de sodio que al reaccionar con los AGVs aumentan la relación CO₂/H₂, ya que el bicarbonato reacciona con los AGV para formar CO₂ gaseoso, mientras que otros como el fosfato de sodio generan todo lo contrario. Chang et al. (2002) y Lee (2004) emplearon bicarbonato de sodio como alcalinizante y obtuvieron relaciones CO₂/H₂ que variaron en el rango 1,6 a 3,0; mientras que Wang et al. (2006), Wang (2007) y Marques (2009) usaron fosfato de sodio y alcanzaron relaciones entre 0,74 a 0,80, 0,6 a 1,1 y 0,13 a 0,5 respectivamente. Teniendo en cuenta lo anterior, para finalizar el pretratamiento se utilizó una solución alcalinizante de fosfato de sodio (3 N).

4.5 Ensayos de potencial bioquímico de hidrógeno-PBH

Para analizar la efectividad del pretratamiento se llevaron a cabo los ensayos de potencial bioquímico de hidrógeno. Se realizaron por triplicado, a una temperatura de 37°C, con una relación sustrato/lodo de 2g CH/g SSV y un pH de 5,4, según lo recomendado por Yela y Peña (2015) y Barrios (2015) respectivamente.

Posterior al pretratamiento, se procedió a realizar una determinación de sólidos volátiles (Figura 4.3) a cada tratamiento, para determinar las condiciones de montaje de cada reactor.

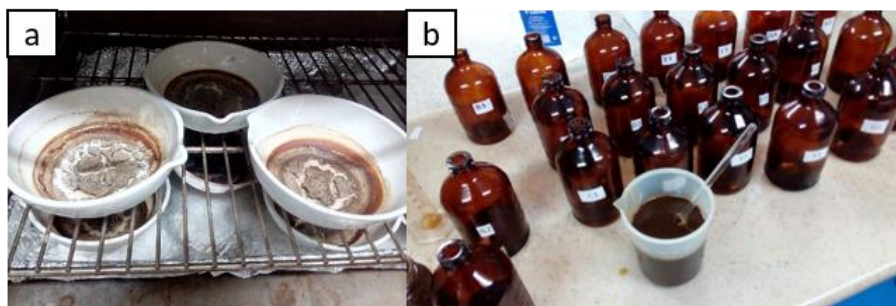


Figura 4.3. Registro fotográfico del montaje realizado. a) Cápsulas después del ensayo de sólidos volátiles; b) Reactores con lodo a punto de ser alimentados con vinaza 15%

La ecuación 4.1 describe la relación sustrato/inóculo utilizada y la ecuación 4.2 muestra el volumen de sustrato en función del volumen de lodo, ya que la combinación de su volumen debe cumplir un total de 400 mL.

$$2 = \frac{V_s * CH_{Totales}}{V_L * SV_{Lodo}} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

$$V_s = 400 - V_L \quad \text{Ecuación 4.2}$$

Donde:

V_L = Volumen de lodo pretratado

V_s = Volumen de sustrato

$CH_{Totales}$ = Concentración de carbohidratos totales del sustrato

SV_{Lodo} = Concentración de sólidos suspendidos volátiles del lodo pretratado

Reemplazando la ecuación 4.2 en la 4.1 se obtiene la ecuación 4.3 la cual se utiliza para determinar el volumen de inóculo y sustrato a adicionar.

$$2 = \frac{(400 - V_L) * CH_{totales}}{V_L * SV_{Lodo}} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

Los volúmenes de inóculo y sustrato adicionados a cada uno de los “tratamientos” se presentan en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5 Volumen de lodo y sustrato adicionado a cada “Tratamiento”

Tratamiento	Volumen de lodo (mL)	Volumen de sustrato (mL)
T1	25	375
T2	26	374
T3	25	375
T4	24	376
T5	25	375
T6	25	375
T7	22	378
T8	24	376

Para realizar el montaje de los reactores fue conveniente seguir estos pasos:

1. Tomar en una probeta de vidrio el volumen de lodo necesario y verterlo en el reactor.
2. Adicionar el sustrato hasta que el volumen total ocupe aproximadamente 380mL, realizando un lavado de la probeta, de esta manera todos los sólidos son arrastrados dentro del reactor
3. Ajustar el pH a 5,4 con fosfato de sodio 3N
4. Completar los 400 mL con el sustrato

Los reactores fueron sellados para garantizar condiciones anaerobias y se ubicaron con su respectivo agitador en la incubadora (Figura 4.4).



Figura 4.4 Reactores ubicados en la incubadora del laboratorio de lodos

Durante el estudio se realizó un seguimiento a la presión y temperatura (ver Figura 4.5). El monitoreo de presión consistió en realizar mediciones manométricas de cada reactor y liberación del biogás en tiempos definidos, llevando un registro detallado. El experimento concluyó cuando la curva de presión en función del tiempo, presentó un comportamiento constante o con tendencia a decaer.



Figura 4.5 Manómetro empleado en el montaje

Según Barrios (2015) a partir de la curva teórica de las presiones totales de biogás (Figura 4.6) se identifican tres fases de crecimiento de las presiones que sirven para determinar el punto de muestreo. Debido a que se tomaría una muestra por reactor, se decidió hacerlo en el punto 3 que está ubicado al final del crecimiento exponencial y donde se encuentra el punto máximo de producción de biogás.

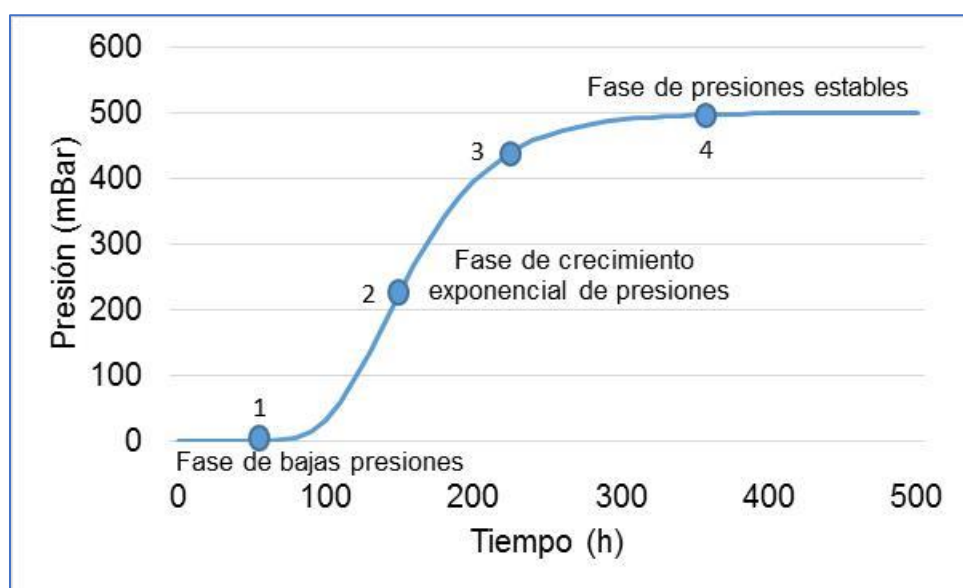


Figura 4.6. Curva teórica de presiones totales

Fuente: Norli et al. (2011) y Pirc et al. (2012)

Las muestras del biogás generado durante el experimento fueron colectadas en viales Exetainer estériles y sellados al vacío (Figura 4.7).

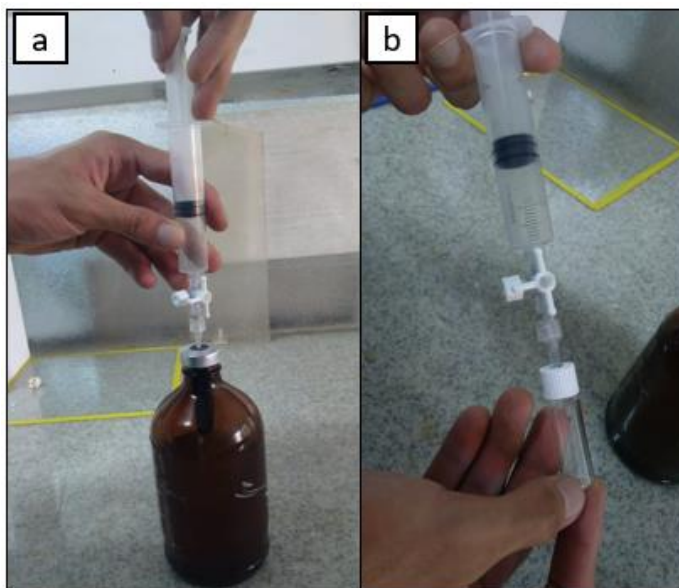


Figura 4.7 Extracción e inyección de biogás. a) reactor del que es extraído el biogás; b) Inyección del biogás en los viales Exetainer

El finalizar cada ensayo se llevó a cabo la determinación de pH, DQO, Carbohidratos totales y AGV's.

4.5.1 Ensayos preliminares para determinar condiciones del montaje

Con el fin de establecer cuáles serían los intervalos de medición de la presión de biogás, concentración de reactivos y la concentración óptima de sustrato, se realizaron dos ensayos preliminares. Los ensayos se realizaron de acuerdo con la relación sustrato/inóculo recomendada por Yela y Peña (2014) y el pH inicial recomendado por Barrios (2015) A 37 °C.

Intervalos de medición y concentración de reactivos. Se realizó un ensayo de PBH, para el cual se aplicaron tres pretratamientos distintos tomando valores de pH y tiempo que permitieran evaluar condiciones extremas de cada factor (pH 1,8-15 h, pH 2,5-27 h y pH 3-6 h) e implementando como ácido el H_2SO_4 , debido a que su uso en pretratamiento químico comparado con el HCl se encuentra más explorado. La finalidad de este ensayo no fue evaluar cada pretratamiento, sino determinar la producción aproximada de biogás que podía llegar a presentarse en los diferentes escenarios (pretratamientos), los intervalos de medición y cualquier otro factor que pueda ser relevante y no se haya tenido en cuenta. Se llevó a cabo el montaje con el lodo proveniente de los tres pretratamientos y su respectivo duplicado, para un total de 6 reactores con intervalos de medición de 1 hora.

Los volúmenes de biogás registrados durante el ensayo fueron de 1.551 mL, 1.737 mL y 1.727 mL para los pretratamientos pH 1,8-15 h, pH 2,5-27 h y pH 3-6 h, respectivamente. A partir de este ensayo se estableció que:

- Los Intervalos de medición serían de 2 horas. Debido a que el ensayo se lleva a cabo a una temperatura controlada, al realizar la medición de la presión con el manómetro presentado anteriormente, los reactores deben ser extraídos de la incubadora por algunos minutos y se someten a temperatura ambiente. Teniendo en cuenta que la temperatura es un factor que afecta la producción de hidrógeno, sus fluctuaciones afectarían el ensayo de manera negativa. Realizando la medición cada 2 horas se busca minimizar la interrupción de la temperatura, sin comprometer la continuidad de la curva de producción de biogás.
- La presión máxima para liberación de biogás debe ser de 700mbar. Se observó que por encima de este valor la producción de biogás por hora disminuye.
- Cuando se realiza el pretratamiento, el ácido debe adicionarse de forma lenta (aprox. 0,05 mL/s) mientras se agita manualmente el beaker, debido a que se observó que al adicionar ácido rápidamente y con agitación magnética ocurre formación de burbujas y el lodo se vuelve esponjoso aumentando el volumen ocupado casi en un 150%.
- La concentración de los ácidos se estableció como 8 N para evitar la dilución del lodo durante el pretratamiento.

Concentración óptima del sustrato (% de dilución de la vinaza). Las características de un agua residual agroindustrial como lo es la vinaza son diferentes a las del agua residual de la PTAR de CAVASA. Principalmente, porque está última tiene un alto contenido de proteínas y la vinaza tiene un alto contenido de carbohidratos y una DQO 7 veces mayor a la del AR CAVASA. Debido a que la vinaza concentrada puede ser tóxica para los microorganismos, fue necesario llevar a cabo un ensayo de biodegradabilidad para determinar su concentración óptima. Se utilizó un inóculo sin pretratamiento y la vinaza fue diluida a diferentes porcentajes, tomando como variable de respuesta el porcentaje de DQO removida, que indica la capacidad que tiene el lodo de degradar este sustrato. Los resultados se encuentran consignados en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6 Concentración de sustrato y remoción de DQO

Concentración	DQO inicial (mg/L)	DQO final (mg/L)	DQO removida
70%	294.021,7	104.035,1	65%
50%	203.888,9	71.733,3	65%
40%	159.687,5	52.666,7	67%
30%	127.878,8	49.481,5	61%
15%	53.113,3	11.442,5	78%
10%	40.442,7	8.794,9	78%

Las concentraciones de 10% y 15 % presentaron la mayor remoción de DQO. Se seleccionó como sustrato la vinaza al 15%, ya que al ser más concentrada es posible optimizar el volumen del reactor.

4.5.2 Ensayo de PBH para determinar el pH, reactivo químico y tiempo de exposición que genere mayor producción de biogás

Se realizó el ensayo de PBH con lodo adaptado proveniente de los 8 pretratamientos mostrados en la Figura 4.8. Se pusieron en marcha 25 reactores, 24 correspondientes a cada pretratamiento por triplicado y un testigo con sacarosa. El testigo se realiza para confirmar la viabilidad de la vinaza como sustrato porque la sacarosa es un sustrato fácilmente asimilable por los microorganismos, entonces en caso de que los reactores con vinaza no tengan un buen desempeño y el que tiene sacarosa si, se podría establecer que el factor inhibidor del PBH es el sustrato y no el pretratamiento.

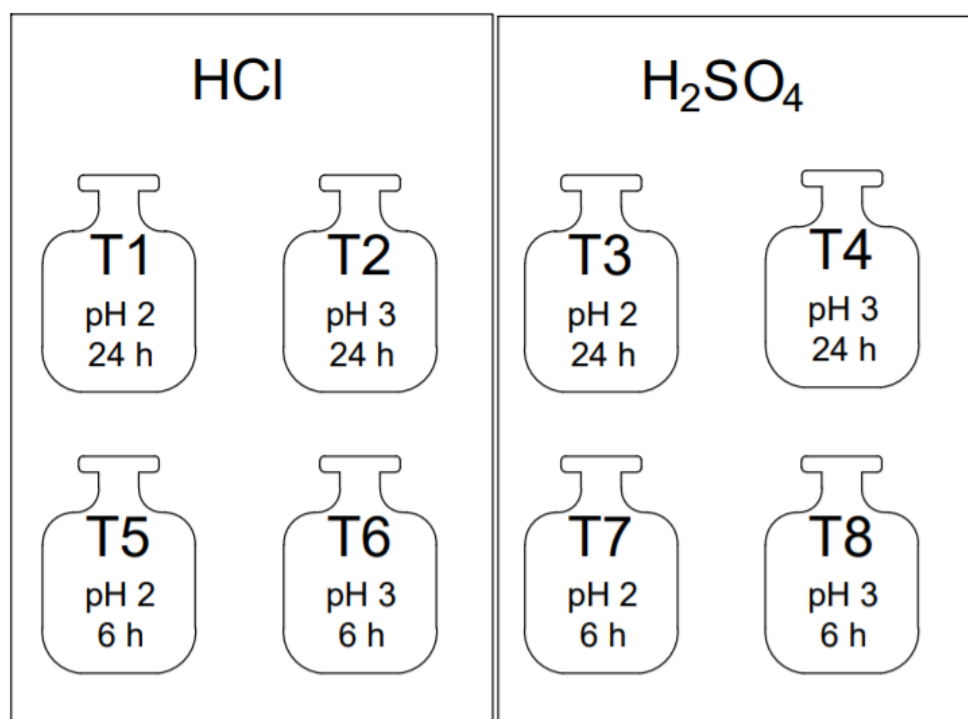


Figura 4.8 Nomenclatura de los reactores

Fueron preparados 13 L de vinaza al 15% con una DQO de 53.133 mg/L. Para cumplir con una relación DQO:P:N de 350:5:1, se adicionó un volumen de una solución de urea (10 g/L) y debido a que el alcalinizante utilizado contenía fósforo éste no fue adicionado.

Los reactores fueron nombrados con la letra T seguida por el número de pretratamiento como fue presentado en la Tabla 4.4, adicionalmente se identificaron con los números del 1 al 3 las réplicas de cada pretratamiento.

Se realizó el monitoreo de presiones cada dos horas de forma continua por 74 horas, tiempo en el cual los reactores llegaron a su fase de estabilización.

4.5.3 Ensayo de PBH para estudiar el pre tratamiento óptimo

Con el objetivo de establecer si las características del inóculo seleccionado, podrían representar alguna interferencia en la fermentación oscura, se realizó el montaje de 4 reactores inoculados con lodo sometido al pretratamiento que llevó a la mayor generación de hidrógeno identificado en el ensayo anterior. Como se puede observar en la Figura 4.9, en 3 de los 4 reactores se utilizó sacarosa, que es un sustrato de fácil asimilación, por lo cual estos resultados establecen un punto de comparación para definir si la vinaza es o no un sustrato factible. Al cuarto reactor no se le adicionó sustrato para determinar el biogás generado únicamente por el lodo y tener conocimiento de la masa de biogás generada por degradación del sustrato.

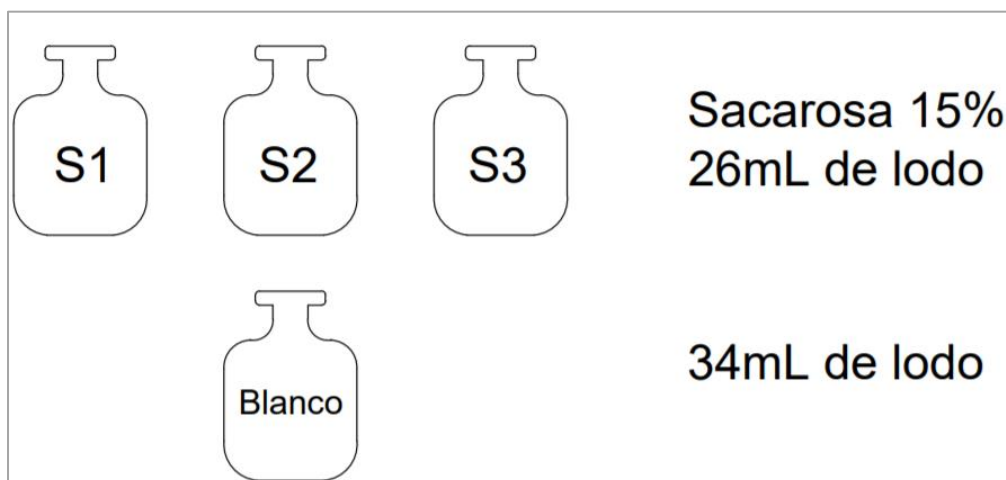


Figura 4.9 Configuración del ensayo de PBH para estudiar el pretratamiento óptimo

Se realizó el monitoreo de presiones cada dos horas de forma continua por 117 horas, tiempo en el cual los reactores llegaron a su fase de estabilización.

4.6 Métodos analíticos

Durante la acidogénesis los compuestos como azúcares y proteínas, se convierten en AGVs, H_2 y ácido carbónico, por lo tanto, es de esperarse que la concentración de carbohidratos presente una reducción al finalizar el montaje. Los AGVs generados ejercen también DQO entonces no se esperan cambios significativos en este último parámetro (Lopez-Vazquez et al., 2017).

Sustrato (vinaza) y sobrenadante del reactor una vez finalizado el ensayo de PHB. Los métodos empleados para realizar la caracterización fisicoquímica del sustrato y el sobrenadante, se muestran en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7 Métodos a emplear para la caracterización de la vinaza

Parámetros Fisicoquímicos	unidades	Técnica de Medición	Método
pH	Unidades	Potenciómetro	Apha (2005)
Alcalinidad Total	mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$	Titulación	Apha (2005)
Orto-Fosfato	mg $\text{PO}_4^{-3} \cdot \text{L}^{-1}$	Cloruro estañoso	Apha (2005)
Nitrógeno Amoniacal Total (NAT)	mg $\text{N-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$	Digestión y titulación	Apha (2005)
DQO total	mg. L^{-1}	Digestión y Espectrofotometría	Apha (2005)
AGVs totales	mg Ac.acetico. L^{-1}	Titulación	Flielld (1987)
Carbohidratos totales	mg. L^{-1}	Fenól-Sulfurico	Dubois (1956)

Inóculo adaptado y pretratado. Los métodos a emplear para la caracterización inicial del inóculo adaptado se muestran en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8 Métodos a emplear para la caracterización del inóculo adaptado y pretratado

Parámetros Fisicoquímicos	unidades	Técnica de Medición	Método
pH	unidades	Potenciómetro	Apha (2005)
ST	mg. L^{-1}	Gravimétrico	Apha (2005)
SV	mg. L^{-1}	Gravimétrico	Apha (2005)
PBH	mL $\text{H}_2 \cdot (\text{gSV} \cdot \text{d})^{-1}$	Medición manométrica	Trevisan et al. (2015)

La evaluación del efecto del pretratamiento químico del inóculo, se realizó a través de ensayos de PBH, debido que constituyen una herramienta útil, rápida y relativamente económica para evaluar el máximo potencial de producción de H_2 de un inóculo, a partir de un determinado sustrato (Trevisan, 2010, Trevisan et al., 2015, Pecorini et al., 2019). Así mismo, se tuvo en cuenta que a partir de los ensayos de PBH es posible proponer parámetros de control para la maximización de la producción de H_2 en reactores anaerobios (por ejemplo de flujo continuo), identificar factores de inhibición y establecer relaciones cinéticas entre sustrato, productos generados (H_2 , AGVs) y microorganismos (Trevisan, 2010, Mu et al., 2014).

4.6.1 Manejo de datos

Composición del biogás. Para realizar esta determinación se tomó la concentración de la muestra de gases y se aplicó la Ecuación 4.4 propuesta por Carminato (2013) y utilizada también por Barrios (2015).

$$C_i = \frac{C_{i(H_2, CH_4, CO_2, N_2)}}{C_{H_2} + C_{CH_4} + C_{CO_2} + C_{N_2}} \quad \text{Ecuación 4.4}$$

Donde:

C_i = Composición (fracción de volumen) del gas de interés (H_2, CH_4, CO_2, N_2)

$C_{i(H_2, CH_4, CO_2, N_2)}$ = Concentración del gas de interés H_2, CH_4, CO_2 y N_2 medida en el cromatógrafo

$C_{H_2} + C_{CH_4} + C_{CO_2} + C_{N_2}$ = Sumatoria de la concentración de H_2, CH_4, CO_2 y N_2 medida

Volumen de gas (H_2, CH_4, CO_2 y N_2) en la cabeza de aire del reactor en condiciones experimentales. Este cálculo es el producto de la fracción de volumen del gas de interés (H_2, CH_4, CO_2, N_2) a condiciones experimentales (CE), y el volumen en la cabeza libre del reactor. Las CE son los valores de presión (atm) y temperatura (°K) correspondientes al momento de muestreo. Para realizar este cálculo se utilizó la Ecuación 4.5.

$$V_{i\ CE} = V_{C.Aire} * C_i \quad \text{Ecuación 4.5}$$

Dónde:

$V_{i\ CE}$ = Volumen (mL) del gas de interés (H_2, CH_4, CO_2 y N_2) en condiciones experimentales

$V_{C.Aire}$ = Volumen de la cabeza de aire (250 mL)

Volumen de gas (H_2, CH_4, CO_2 y N_2) en la cabeza de aire del reactor en condiciones normales. Para este cálculo se tuvo en cuenta la ecuación 4.6, la cual tiene en cuenta la composición de las muestras tomadas de la cabeza de aire y las CE, para determinar el volumen del gas de interés (H_2, CH_4, CO_2, N_2) en condiciones normales (273,15°K y 1 atm).

$$V_{i\ CN} = \frac{(V_{i\ CE}) * (P_{CE}) * (T_{CN})}{(P_{CN}) * (T_{CE})} \quad \text{Ecuación 4.6}$$

Dónde:

$V_{i\ CN}$ = Volumen (mL) del gas de interés (H_2, CH_4, CO_2 y N_2) en condiciones normales

$V_{i\ CE}$ = Volumen (mL) del gas de interés (H_2, CH_4, CO_2 y N_2) en condiciones experimentales

P_{CE} = Presión total (atm) medida con el manómetro en condiciones experimentales

P_{CN} = Presión (1 atm) en condiciones normales

T_{CE} = Temperatura a condiciones experimentales (°K)

T_{CN} = Temperatura (273,15 °K) en condiciones normales

Rendimiento de H₂. Este cálculo se realizó mediante la ecuación 4.7 teniendo en cuenta la producción máxima (mol) de H₂ y la cantidad de carbohidratos consumidos (mol glucosa).

$$Y = \frac{n_i}{n_{Carbohidratos}} \quad \text{Ecuación 4.7}$$

Dónde:

Y = Rendimiento (mol H₂. mol glucosa consumida⁻¹)

n_i = Producción máxima de H₂ (mol)

$n_{Carbohidratos}$ = moles de glucosa consumida

4.6.2 Análisis estadístico

En el análisis estadístico de este experimento se empleó un diseño factorial de 2³, donde se estudian 3 factores (pH, Reactivo químico (RQ) y tiempo de exposición) en dos niveles cada uno. Estos 8 tratamientos diferentes y su representación geométrica se muestran en la Figura 4.10, donde la región experimental es un cubo rectangular, cuyos vértices son los ocho tratamientos.

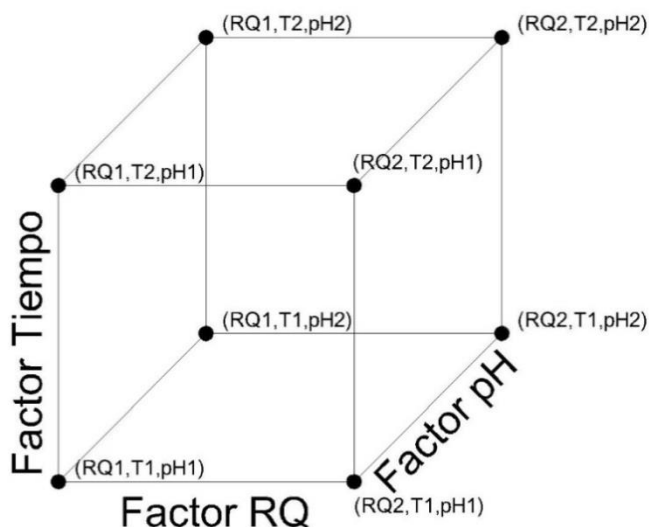


Figura 4.10. Representación geométrica del diseño factorial 2³

Modelo estadístico. La variable de respuesta “Y” puede describirse mediante el modelo de efectos que está dado por la ecuación 4.8.

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl} \quad \text{Ecuación 4.8}$$

Donde:

μ = Media general

α_i = El efecto del nivel i-ésimo del factor A

β_j = El efecto del nivel j del factor B

γ_k = El efecto del nivel k en el factor C

$(\alpha\beta)_{ij}$, $(\alpha\gamma)_{ik}$ y $(\beta\gamma)_{jk}$ = Efectos de interacción dobles (de dos factores) en los niveles ij , ik y jk , respectivamente

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ = el efecto de interacción triple en la combinación o punto ijk

ε_{ijkl} = el error aleatorio en la combinación $ijkl$

l = Réplicas del experimento

Hipótesis de interés. Se tienen 7 efectos de interés y con ellos se pueden plantear las 7 hipótesis nulas, cada una aparejada con su correspondiente hipótesis alternativa.

- **Hipótesis nula (H0).** Los factores pH, reactivo químico y tiempo de exposición, no afectan significativamente la variable de respuesta Presión Máxima de Biogás.
- **Hipótesis alterna (H1).** Los factores pH, reactivo químico y tiempo de exposición, afectan significativamente la variable de respuesta Presión Máxima de biogás.

$$\begin{aligned} H_o: \alpha_i &= 0 \\ H_1: \alpha_i &\neq 0 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} H_o: \beta_j &= 0 \\ H_1: \beta_j &\neq 0 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} H_o: \gamma_k &= 0 \\ H_1: \gamma_k &\neq 0 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} H_o: (\alpha\beta)_{ij} &= 0 \\ H_1: (\alpha\beta)_{ij} &\neq 0 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} H_o: (\alpha\gamma)_{ik} &= 0 \\ H_1: (\alpha\gamma)_{ik} &\neq 0 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} H_o: (\beta\gamma)_{jk} &= 0 \\ H_1: (\beta\gamma)_{jk} &\neq 0 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} H_o: (\alpha\beta\gamma)_{ijk} &= 0 \\ H_1: (\alpha\beta\gamma)_{ijk} &\neq 0 \end{aligned}$$

Pruebas o test estadísticos. Para evaluar estadísticamente el efecto del pH, reactivo químico y tiempo de exposición sobre la presión de Biogás, se aplicaron a través del programa Minitab v.16 las siguientes pruebas o test estadísticos: i) Valores individuales, ii) Interacción doble, iii) Interacción triple, iv) Análisis de varianza (ANOVA), v) Prueba de normalidad y vi) POST ANOVA.

5 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Cada pretratamiento fue evaluado con tres réplicas y una vez concluida la fase experimental se observó que para algunos pretratamientos había una réplica que presentaba comportamiento atípico, razón por la cual para el análisis de resultados se decidió descartar una de las réplicas para cada tratamiento. La réplica a descartar fue escogida determinando el ejemplar que presentaba mayor varianza respecto a las demás réplicas.

5.1 Efecto del pretratamiento químico del inóculo sobre el volumen de biogás

Respecto a las características del inóculo adaptado y pretratado, las cuales se presentan en el Anexo 1, Tabla 9.1, se resalta que la concentración de los sólidos volátiles (SV) aumenta al aplicarse el pretratamiento.

Para determinar el volumen de biogás generado, se implementó la ecuación de los gases ideales, en la cual se utilizaron los valores de presión recolectados a lo largo de los ensayos de PBH (Anexo 2, Tabla 9.3 y Tabla 9.4), el volumen de la cabeza de aire en los reactores y la temperatura de operación.

Al generar la gráfica de volumen de biogás en función del tiempo se puede comparar el rendimiento de los pretratamientos en el tiempo, también diferenciar y establecer la duración de las etapas metabólicas. En la Figura 5.1 se presentan las lecturas de presión ejercida por el gas en los reactores y el volumen acumulado de biogás correspondiente. Los datos se presentan en el Anexo 2, Tabla 9.5.

Para todos los reactores a excepción de una réplica de T1 (T1.2), es posible diferenciar las fases establecidas en la curva teórica propuesta por diferentes autores (Khanal et al., 2004; Norli et al., 2011; Pirc et al., 2012). Se evidencia una fase de latencia debido a la adaptación del inóculo. La segunda fase representa una generación máxima, gracias a la rápida conversión de la materia orgánica presente en el agua residual a AGVs y biogás; y finalmente, una fase estacionaria atribuida a la baja producción de biogás debido a la poca disponibilidad de sustrato para los microorganismos.

Adicionalmente, los tratamientos que proporcionaron mayor producción de biogás fueron T2, T5, T7 y T8, razón por la cual fueron los tratamientos seleccionados para realizar el análisis de composición de biogás que se presenta en el ítem 5.3.

Para determinar el efecto de cada tipo de pretratamiento químico sobre la generación de biogás, se realizó un análisis estadístico de los datos que se encuentran registrados en el Anexo 2. Para el análisis estadístico se desarrolló un diseño factorial de 2^3 compuesto por los tres factores y dos niveles: i) Reactivo

químico (HCl y H_2SO_4 , ii) Tiempo de exposición (6 h y 24 h) y, iii) pH (2 y 3). Los valores con los cuales se realizó el análisis estadístico se encuentran consignados en Anexo 2, Tabla 9.5.

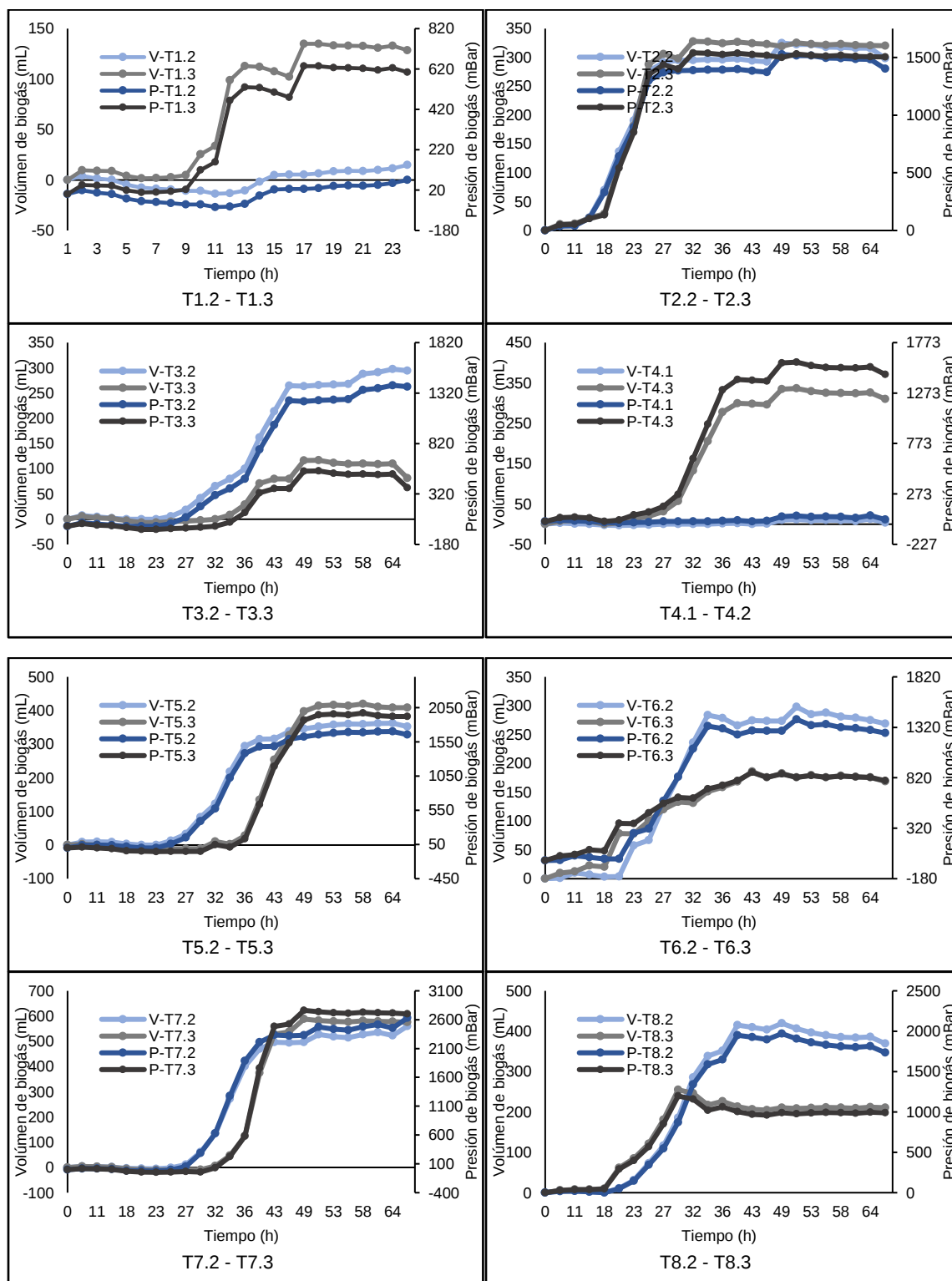


Figura 5.1. Volumen acumulado de biogás del Ensayo

5.2 Efecto de cada factor en la generación de volumen de biogás

En la Figura 5.2 que presenta los valores máximo, mínimo y promedio de volumen de biogás generado por cada pretratamiento, se observa que tanto el reactivo químico como el pH no ejercieron una influencia significativa sobre la producción de biogás, ya que independiente del tipo de reactivo o el valor del pH se presentaron rangos significativos de variación del volumen, sin que se pueda determinar tendencias. Por el contrario, el tiempo de exposición al pretratamiento si demostró ser un factor influyente en la generación de biogás.

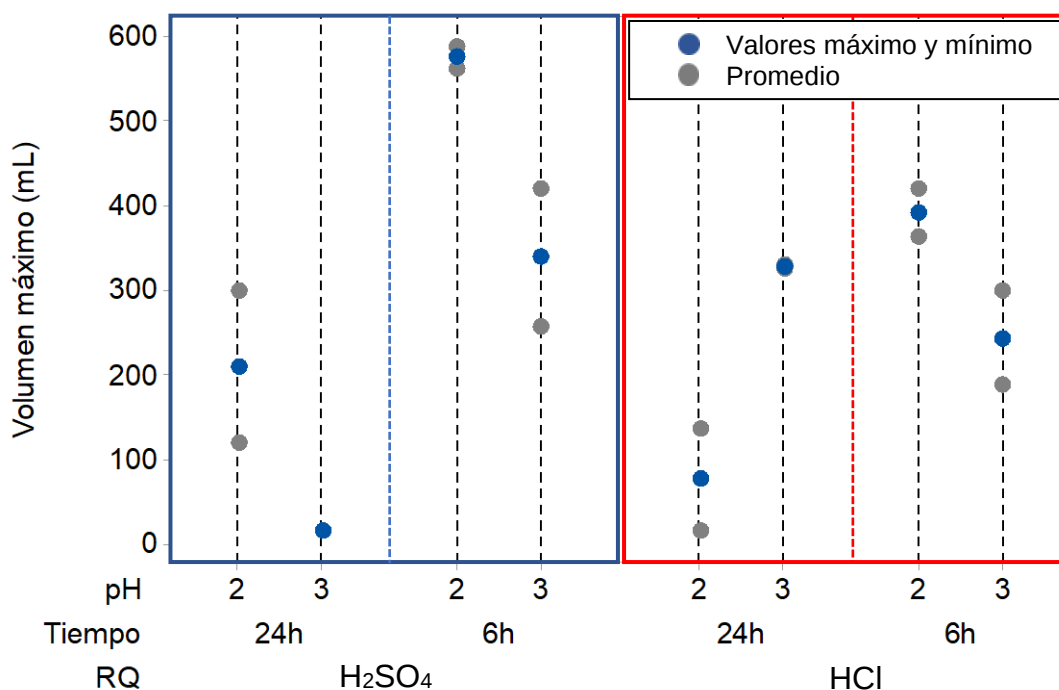


Figura 5.2. Diagrama de valores individuales de volumen máximo de biogás generado por cada pretratamiento

Analizando específicamente los valores medios, estos indicaron que para seis de los ocho tratamientos, con un tiempo de exposición de 6 horas se tiene más del doble de generación de biogás que con lo obtenido para 24 horas.

5.2.1 Efecto de la combinación entre los factores sobre el volumen de biogás generado

La interacción entre dos factores describe la influencia de ellos sobre la variable de respuesta. En la Figura 5.3, se presentan los gráficos de interacción entre los factores del presente estudio. Se aprecia una interacción significativa entre el pH y el tipo de reactivo químico, ya que con H₂SO₄ se presentó una mayor producción

de biogás a pH 2 que a pH 3. Sin embargo, con HCl se presentó mayor producción de biogás a pH 3 que a pH 2. Por lo tanto, se infiere que el aumento o disminución en la generación de biogás no depende directamente de la variación de un factor, sino de la combinación entre los dos factores mencionados.

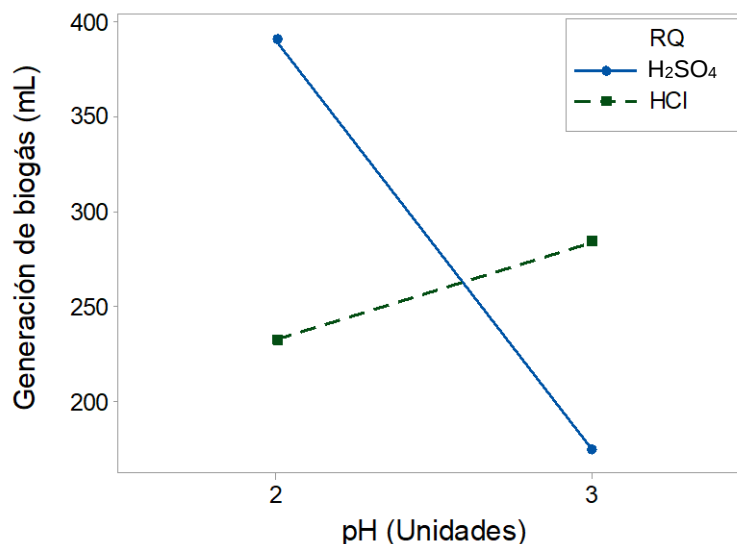


Figura 5.3. Interacción de reactivo químico y pH para la generación de volumen de biogás

En la Figura 5.4 se presentan dos gráficos, en el primero se relaciona el efecto del tiempo de exposición con el pH, donde la mayor producción de biogás se alcanzó a pH 2; en el segundo se relaciona el efecto del tiempo de exposición con el reactivo químico, donde la mayor producción de biogás se alcanzó con H₂SO₄, en los dos gráficos se utiliza como variable de respuesta el volumen máximo de biogás generado. Estas dos interacciones tienen la misma tendencia, donde la generación de biogás aumenta cuando el tiempo de pretratamiento disminuye.

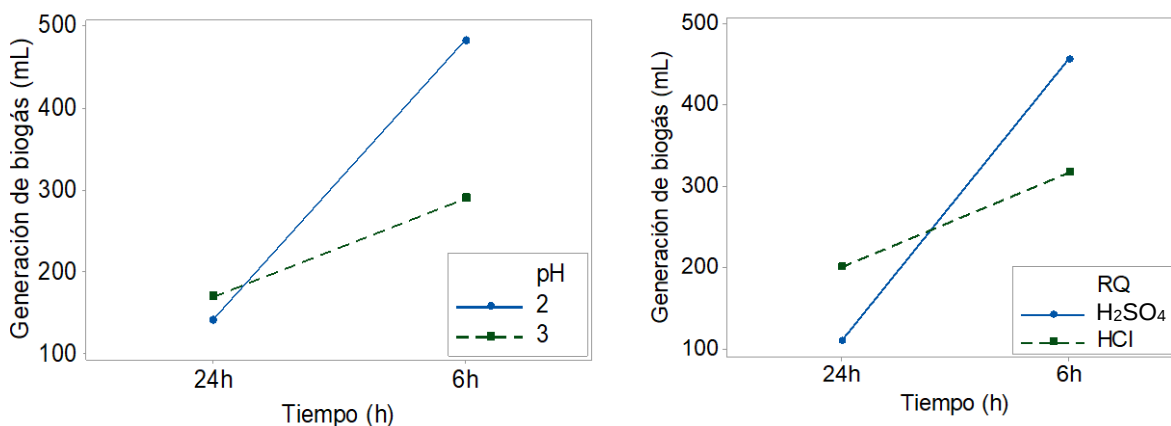


Figura 5.4. Interacción de pH y reactivo químico con el tiempo para la generación de biogás

De acuerdo con Stringer et al. (2011) las condiciones ambientales a las que se encuentra sometido un microorganismo durante el enquistamiento, es decir el pretratamiento, impactan la capacidad de estos para des-enquistarse y retornar a la célula. Por lo tanto, se podría afirmar que un tiempo de exposición de 24 horas, al prolongar el periodo de enquistamiento de los microorganismos hidrogenogénicos del inóculo, generó una reducción en su riqueza y abundancia.

5.2.2 Análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significancia de cada factor e interacción

Con el fin de determinar si los factores tuvieron un efecto significativo sobre la variable de respuesta (Volumen máximo de biogás), se estableció un nivel de significancia igual a 0,05, el cual se comparó con el valor “p” resultante del ANOVA para cada factor e interacción.

La Tabla 5.1 presenta los resultados del análisis de varianza (ANOVA) aplicado a los valores de volumen máximo acumulado. Para realizar este análisis se empleó un ANOVA de GML (Modelo Lineal General) mediante el programa estadístico Minitab v. 17.

Tabla 5.1. Análisis de varianza para un diseño experimental de 2³ factorial

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
RQ	1	2.367	2.367	0,42	0,536
Tiempo	1	212.778	212.778	37,54	0,000
pH	1	27.006	27.006	4,76	0,061
RQ*Tiempo	1	52.873	52.873	9,33	0,016
RQ*pH	1	71.240	71.240	12,57	0,008
Tiempo*pH	1	49.157	49.157	8,67	0,019
RQ*Tiempo*pH	1	31.976	31.976	5,64	0,045
Error	8	45.347	5.668		
Total	15	492.743			

De acuerdo con lo anterior, el único factor individual que tuvo una influencia significativa sobre los cambios en el volumen máximo de biogás fue el tiempo; debido a que presenta un valor “p” cercano a cero y, este es menor que el nivel de significancia establecido (0,05). Respecto a las interacciones, todas presentaron un efecto significativo, ya que sus valores “p” se encuentran por debajo de 0,05;

sin embargo, teniendo en cuenta que entre más cercano a cero sea el valor “p”, más significancia tiene el efecto, la interacción más significativa fue la de RQ*pH seguida por las otras dos interacciones Tiempo*pH y RQ*Tiempo. La fuerte interacción de RQ*pH podría ser causada por la diferencia entre las constantes de acidez (K_a) de los reactivos, y la concentración de los subproductos como Cl^- y SO_4^{2-} que quedan en el inóculo después del pretratamiento, sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales para entender con más precisión este comportamiento.

Según el análisis anterior, el pretratamiento que proporcionó mayor PBH fue H_2SO_4 , a pH 2 por 6 horas.

Prueba de normalidad. La prueba de normalidad de residuos compara la función de distribución acumulada empírica (ECDF-Empiric Cumulative Distribution Function) de los datos de la muestra con la distribución esperada, si los datos fueran normales. Si la diferencia observada es suficientemente grande, significa que los datos pertenecen a una población normal y son aptos para ser procesados en un ANOVA. Si el valor “p” de esta prueba es menor que el nivel de significancia (α) elegido, se concluye que se trata de una población no normal y los datos no serán aptos para ser procesados en un ANOVA.

De acuerdo con la Figura 5.5, la distribución que presentaron los datos se ajusta adecuadamente a la línea recta (color verde). Adicionalmente, el valor obtenido de “p” ($p > 0,15$) es mayor que el nivel de significancia ($\alpha = 0,05$), lo cual indica que los datos siguen una distribución normal, por lo tanto son válidos para ser utilizados en un ANOVA.

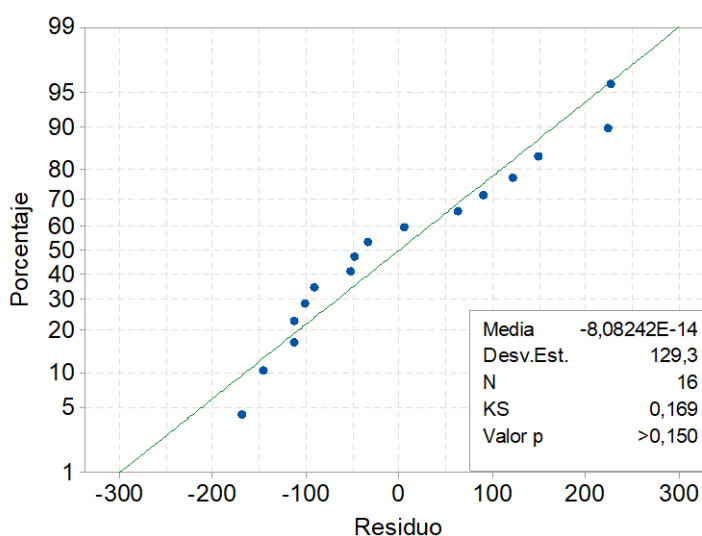


Figura 5.5. Prueba de normalidad para los valores de volumen máximo acumulado

5.2.3 Determinación y evaluación de las variables cinéticas de Gompertz para establecer el efecto de los factores en cada fase de la curva de generación de biogás

Al determinar el efecto de los factores sobre cada variable cinética, es posible encontrar un pretratamiento que optimice la producción de biogás, reduciendo los costos relacionados con el tiempo de producción e incrementando la producción final de biogás.

La evolución de la producción de biogás en el tiempo utilizando operación tipo batch, es descrita frecuentemente mediante la ecuación de Gompertz, que ha sido modificada de su formulación inicial para incluir parámetros con significado biológico en lugar de matemático. La curva modificada de Gompertz (Ecuación 5.1) describe la evolución en el tiempo de la generación de biogás utilizando tres parámetros, que son: potencial de producción de biogás (P_s), tasa de producción máxima de biogás (R_m) y el periodo de latencia (λ) (De Gioannis et al., 2013).

$$P = P_s \exp\left[-\exp\left(\frac{R_m}{P_s}(\lambda - t) + 1\right)\right] \quad \text{Ecuación 5.1}$$

Implementando el modelo modificado de Gompertz se pueden establecer los parámetros cinéticos correspondientes al comportamiento de generación de biogás de cada reactor, nombrados como λ (Periodo de latencia), R_m (Tasa de producción máxima) y P (Producción máxima de biogás).

Para la obtención de las variables cinéticas del modelo de Gompertz, se lleva a cabo una regresión no lineal a los valores de volumen de biogás generado (Anexo 2, Tabla 9.5 y Tabla 9.6), utilizando Excel, partiendo de la ecuación que define el modelo modificado de Gompertz e implementando la herramienta Solver, de modo que se modifiquen las variables cinéticas hasta obtener los valores que se ajusten a las presiones acumuladas registradas. Los valores obtenidos de las variables se presentan en la Tabla 5.2.

De acuerdo con (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009) los periodos de latencia típicos para la generación de H_2 bajo condiciones mesofílicas están entre 2 y 4 días. Al comparar este rango con los valores obtenidos en los tratamientos, se observa que estos últimos son menores, representando un factor favorable debido a que bajos periodos de latencia implican mayor adaptabilidad del inoculo, lo que puede resultar en menores costos de operación.

Para determinar la significancia de cada factor respecto a las variables cinéticas se realizaron tres ANOVA, las cuales tuvieron como variable de respuesta cada una de las tres variables cinéticas mencionadas anteriormente. Los datos son reportados en el Anexo 3; Tabla 9.9, Tabla 9.10 y Tabla 9.11.

Tabla 5.2. Parámetros cinéticos de las curvas de producción acumulada de Biogás

Tratamiento	λ (h)	Rm(mL/h)	P _s (mL)
T1.2	-	-	-
T1.3	28,2	14,2	128,6
T2.2	15,8	30,4	311,3
T2.3	18,4	45,7	324,3
T3.2	28,7	15,8	298,5
T3.3	33,5	10,6	107,4
T4.1	45,4	12,0	9,5
T4.2	27,7	33,6	324,3
T5.2	27,1	31,2	356,8
T5.3	37,0	45,1	419,5
T6.2	22,4	28,2	282,2
T6.3	13,9	9,2	179,2
T7.2	29,6	61,5	523,9
T7.3	34,3	72,1	583,1
T8.2	23,9	37,6	399,4
T8.3	19,7	29,6	216,6

El ANOVA determinó que el único factor significativo para Rm y P_s fue el tiempo de exposición, con valores “p” de 0,015 y 0,030 respectivamente. Para λ ningún factor fue significativo. En cuanto a las interacciones, la única variable cinética en la cual se obtuvieron valores significativos fue Rm, donde RQ*T y pH*T resultaron ser interacciones significativas con valores “p” de 0,28 y 0,005 respectivamente

Una vez determinado el factor significativo y las interacciones significativas, se calcula para cada nivel la media de P_s y de Rm para Tiempo de exposición, y de Rm para RQ*T y pH*T, con la finalidad de definir los niveles que permiten obtener los mejores resultados para la generación de biogás, en términos de las variables cinéticas de Gompertz. Para lo anterior, se implementó el método de comparación de Tukey. Los resultados se presentan en la Tabla 5.3.

Los resultados indican que el tiempo de exposición de 6 horas, comparado con 24 horas, permite obtener una mayor P_s y Rm. Para las interacciones RQ*T y pH*T, los mayores valores de Rm se obtienen para H₂SO₄*6h (50,21 mL/h) y pH2*6h (52,49 mL/h). De acuerdo con estos resultados, se elige como pretratamiento óptimo T7 (H₂SO₄-6h a pH 2).

En el análisis de los volúmenes máximos de biogás y el análisis de las variables cinéticas de Gompertz se llega a la misma conclusión, el pretratamiento que favorece la generación de biogás y consecuentemente el PBH, es T7 (H₂SO₄-6h a pH 2), definiendo este como el pretratamiento óptimo.

Tabla 5.3. Método de comparación de Tukey

Factor o interacción	Nivel	Variable cinética	Media
Tiempo de exposición	6 h	P_s (mL)	370,08
	24 h		189,63
Tiempo de exposición	6 h	R_m (mL/h)	39,32
	24 h		20,38
RQ*T	H_2SO_4 * 6h	R_m (mL/h)	50,21
	HCl * 6h		28,44
	HCl * 24h		26,13
	H_2SO_4 * 24h		18,01
pH*T	2 * 6h	R_m (mL/h)	52,49
	3 * 24h		30,44
	3 * 6h		26,16
	2 * 24h		13,71

5.3 Composición de biogás

Con la finalidad de conocer la composición del biogás producido durante el ensayo de PBH, se llevó a cabo un análisis de la composición del biogás generado en los reactores que presentaron mayor producción de biogás, a partir de los datos presentados en el Anexo 2, Tabla 9.7. Los resultados se presentan en la Tabla 5.4.

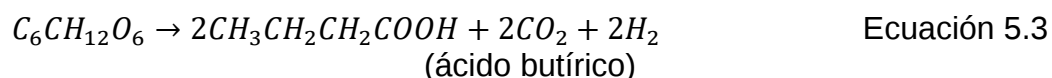
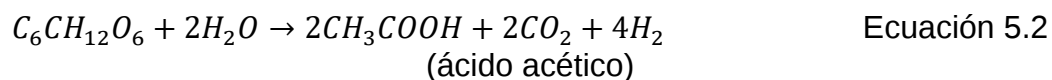
Tabla 5.4. Composición de biogás en reactores con mejor rendimiento para la generación de biogás

Tto	Volumen de biogás (mL)	Fracción molar de Biogás (moles/mol Total)				
		H_2		CH_4	CO_2	
		Rango	Promedio	Rango	Rango	Promedio
T2	316	0,36-0,35	0,36	0,00-0,00	0,64-0,65	0,65
T5	388	0,40-0,42	0,41	0,00-0,00	0,58-0,60	0,59
T7	580	0,40-0,54	0,47	0,00-0,00	0,46-0,60	0,53
T8	296	0,26-0,72	0,49	0,00-0,00	0,28-0,74	0,51

Nota: Las muestras de biogás arrojaron presencia de N_2 . Sin embargo, los valores fueron eliminados del cálculo porcentual, porque de acuerdo con el tipo de ensayo ejecutado y las presiones ejercidas por el biogás al momento de tomar la muestra, no es significativa la cantidad esperada de este gas. La presencia de N_2 en las muestras se asoció con posibles errores experimentales en la inyección y/o extracción del biogás al vial (ingreso de N_2 atmosférico) o contaminación del vial (Cardenas, 2019).

A continuación, se realiza el análisis de la composición de gases en las muestras:

Hidrogeno y Dióxido de carbono: de acuerdo con las ecuaciones 5.2 y 5.3 sugeridas por Ghimire et al. (2015), las cuales describen la generación de H₂ a través de fermentación oscura, por la conversión de glucosa en ácido acético y butírico, la relación teórica de CO₂/H₂ estará entre 0,5 y 1.



Durante el ensayo se obtuvieron relaciones CO₂/H₂ entre 0,79 y 2,13, las cuales al ser comparadas con las obtenidas por otros autores (García-Depraect y León-Becerril, 2018) y por la teórica, reflejan mayores valores.

La prevalencia del CO₂ sobre el H₂ que incide en un mayor valor de la relación, puede ser atribuido a factores tales como el consumo de hidrógeno por parte de microorganismos acetogénicos (Saady, 2013) o de bacterias como *Clostridium barkeri*, involucradas en la ruta metabólica de producción de etanol o ácido láctico y dióxido de carbono. Estos microorganismos pueden encontrarse en el reactor debido a su presencia en el sustrato (Ortigueira et al., 2015). De igual forma, condiciones ambientales y operacionales que pueden generar un amplio rango de productos intermediarios y subproductos, afectaron el contenido de CO₂ y de H₂ (Ghimire et al., 2015).

Metano: Teniendo en cuenta que durante la digestión anaerobia, en ausencia de arqueas metanogénicas se espera la producción de hidrógeno y dióxido de carbono (Krupp y Widmann, 2009) y, que en el ensayo se alcanzaron valores de cero o cercanos a cero de metano, se evidencia la efectividad del pretratamiento químico implementado para la eliminación de las arqueas metanogénicas, coincidiendo con los estudios realizados por Santos et al. (2014) y García-Depraect y León-Becerril (2018), en donde no reportan presencia de metano en el gas muestreado, durante la generación de hidrógeno a partir de vinaza.

5.3.1 Evaluación del efecto de los factores sobre la fracción de hidrógeno en el biogás

Con la finalidad de evaluar el efecto de cada factor experimental (Reactivo químico, pH y tiempo de exposición) sobre la proporción de hidrógeno en el biogás, se analizaron los valores de fracción de hidrógeno para cada factor y sus niveles correspondientes, ya que no se obtuvieron datos suficientes para realizar

un análisis de varianza. Para este análisis se utilizan los valores de composición de biogás para los reactores con mejor rendimiento que se presentan en la Tabla 5.4. Estos valores se agruparon en función del pretratamiento aplicado y se realizó un promedio de la fracción de hidrógeno en el biogás para cada agrupación. Por ejemplo, para determinar la fracción de hidrógeno en el biogás generado por los pretratamientos realizados con **HCl**, se realiza un promedio de la fracción de H_2 en el biogás correspondiente a T2 (**HCl**, 24h, pH3) y T5 (**HCl**, 6h, pH2), en el cual se obtiene un valor de 0,38 mol H_2 /mol biogás. De la misma forma, para el **H₂SO₄** se realiza un promedio de la fracción de H_2 en el biogás correspondiente a T7 (**H₂SO₄**, 6h, pH2) y T8 (**H₂SO₄**, 6h, pH3), en el cual se obtiene un valor de 0,48 mol H_2 /mol biogás. Al realizar este proceso para los niveles de cada factor experimental se obtienen los valores presentados en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5. Fracción de hidrógeno en el biogás por cada factor experimental

Factor	Nivel	mol H_2 /mol biogás	
		Rango	Promedio
Reactivo químico	HCl	0,35-0,42	0,38
	H ₂ SO ₄	0,26-0,72	0,48
pH	3	0,26-0,72	0,42
	2	0,40-0,54	0,44
Tiempo de exposición	24h	0,35-0,36	0,36
	6h	0,26-0,72	0,34

Los valores de fracción de hidrógeno alcanzados son similares a los obtenidos por Santos et al. (2014) y García-Depraect et al. (2019), quienes reportan valores entre 0,30 y 0,57 mol H_2 /mol biogás y entre 0,37 y 0,73 mol H_2 /mol biogás respectivamente.

De acuerdo con los valores presentados en la Tabla 5.5, la fracción de hidrógeno en el biogás fue mayor con H₂SO₄ (0,48 mol H_2 /mol biogás) que con HCl (0,38 mol H_2 /mol biogás). En cuanto al pH, la fracción de hidrógeno en el biogás es mayor al implementar pH 2 (0,44 mol H_2 /mol biogás). Este resultado concuerda con lo reportado por Lee et al. (2009) quienes estudiaron el H₂SO₄, HCl y HNO₃ a pH 1, pH 2 y pH 3 en el pretratamiento químico, para la generación de hidrógeno, donde se encontró una mayor generación con H₂SO₄ y pH 2. Panagiotopoulos et al. (2012) evaluaron el efecto de diferentes ácidos, reportando mayor generación con H₂SO₄.

En cuanto al tiempo de exposición, la proporción de hidrógeno en el biogás fue mayor con 24 horas (0,36 mol H_2 /mol biogás) que con 6 horas (0,34 mol H_2 /mol biogás). Estos resultados pueden ser atribuidos en parte, a la posible degradación del lodo durante el tiempo transcurrido en el pretratamiento químico, tiempo

durante el cual se pudo favorecer la conversión de material orgánico de degradación lenta a moléculas con bajo peso molecular fácilmente biodegradables. Por otro lado, de acuerdo con lo sugerido por Devlin et al. (2011), la lisis celular lleva a la liberación de los compuestos orgánicos intracelulares permitiendo el incremento de la tasa y eficiencia de los procesos de digestión, factores que pueden favorecer la producción de hidrogeno y se pueden presentar en la medida que el tiempo del pretratamiento fue mayor.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son consistentes con los reportados por Assawamongkholsiri et al. (2013), quienes reportan un incremento en la concentración de carbohidratos solubles y en la generación máxima de hidrógeno al implementar un tiempo de pretratamiento de 24 horas comparado con 6, 12, y 18 horas.

5.3.2 Evaluación del efecto de los factores sobre la eficiencia de generación de H₂

Para la evaluación y comparación del efecto de los factores sobre la eficiencia de producción, se analiza la eficiencia de generación de hidrógeno en los reactores que presentaron mayor generación de biogás en el ensayo. La eficiencia se determina relacionando los moles de hidrogeno generadas con los carbohidratos totales removidos (en términos de glucosa) a lo largo del ensayo. Los cálculos para la determinación de la eficiencia se encuentran en el Anexo 2, Tabla 9.8. Los resultados se presentan en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6. Determinación de la eficiencia de generación de H₂

Tratamiento	H ₂ generado (mol/L)	Glucosa consumida (mol/L)	Eficiencia de generación de H ₂ (molH ₂ / mol glucosa)
T2	0,0125	0,0390	0,320
T5	0,0177	0,0382	0,465
T7	0,0303	0,0392	0,770
T8	0,0141	0,0357	0,415

Según los valores presentados en la tabla anterior, los tratamientos con 6 horas (T5, T7 y T8), presentan una eficiencia de generación de hidrógeno superior al de 24 horas (T2), corroborando lo observado en el análisis del efecto de cada factor sobre la generación de biogás (Ítem 1.2), donde se determinó que el factor tiempo es el que tiene un efecto más significativo sobre el PBH, y que el mejor nivel de pretratamiento es con 6 horas.

El tratamiento que presentó mayor eficiencia fue T7 (H_2SO_4 , pH2, 6h) lo cual coincide con el análisis del volumen de generación de biogás, donde este fue el tratamiento que presentó mayor volumen generado. De igual forma, el resultado coincide con el estudio de las variables cinéticas de Gompertz, en el cual T7 proporciona los mejores valores para R_m y P .

Cuando se compara la eficiencia de T7 (0,77 mol H_2 /mol glucosa) con la eficiencia teórica (4 mol H_2 /mol de glucosa), se observa que es mucho menor. Este comportamiento se atribuye posiblemente por la degradación incompleta de los compuestos orgánicos presentes en la vinaza, como resultado de la complejidad propia de los compuestos y de la presencia de diferentes rutas metabólicas que no conllevan a la producción de hidrógeno o incentivan su consumo (Hoarau et al., 2018). Sin embargo, es un valor que se ajusta a los resultados de otros estudios experimentales bajo condiciones similares.

Respecto al tratamiento de vinaza como sustrato para la producción de hidrógeno, Sydney et al. (2018) obtuvieron 0,97 mol H_2 /mol glucosa utilizando como sustrato vinaza más jugo de caña de azúcar; Albanez et al. (2016) obtuvieron una eficiencia de 0,76 mol H_2 /mol glucosa usando como sustrato una mezcla de molasas (33%) y de vinaza (67%). Adicionalmente, en el estudio desarrollado por Lazaro et al. (2014) en el cual se utilizó un inóculo proveniente de un reactor UASB de la PTAR de un matadero para el tratamiento de vinaza al 20%, se obtuvo una eficiencia de 0,83 mol H_2 /mol glucosa. Esto indica que los resultados obtenidos en este estudio tienen consistencia con los experimentos desarrollados en el mismo campo.

Por otro lado, respecto al tratamiento de otros residuos agroindustriales, Argun y Kargi (2009) aplicaron un pretratamiento químico al inóculo durante 17 h y obtuvieron una eficiencia de 0,19 mol H_2 /mol glucosa, con la fermentación oscura de residuos de molienda de trigo (DQO 20 g/L). Mohammadi et al. (2011) aplicaron pretratamiento ácido a un inóculo anaerobio utilizando como sustrato agua residual de la producción de aceite de palma (DQO 49 g/L), obteniendo una eficiencia de 0,04 mol H_2 /mol glucosa. Barrios (2015) aplicó pretratamiento térmico y químico a un inóculo proveniente de la PTAR de una industria de sacrificio de ganado, al igual que en este estudio, para la generación de hidrógeno a partir de agua residual de la extracción del almidón de yuca (DQO 2,7 g/L), alcanzando una eficiencia de 1,1 mol H_2 /mol glucosa.

Cabe resaltar que las diferencias entre sustratos pueden generar diferentes dinámicas en las poblaciones microbianas, razón por la cual hay dificultades reproduciendo los rendimientos y eficiencia entre diferentes estudios (Ortigueira et al., 2015).

5.4 Evaluación del mejor pretratamiento utilizando sacarosa como sustrato

Para evaluar el rendimiento y la eficiencia del mejor pretratamiento en condiciones de sustrato ideales, se realizó un ensayo de PBH utilizando como sustrato sacarosa, el cual es un sustrato de fácil asimilación. Adicionalmente, se estudió el comportamiento de un reactor en el cual no se adicionó sustrato, con la finalidad de determinar si se genera biogás a partir de la materia orgánica presente en el inóculo. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se presentan las lecturas de presión ejercida por el gas en los reactores y el volumen acumulado de biogás correspondiente. Los datos se presentan en el Anexo 2, Tabla 9.6.

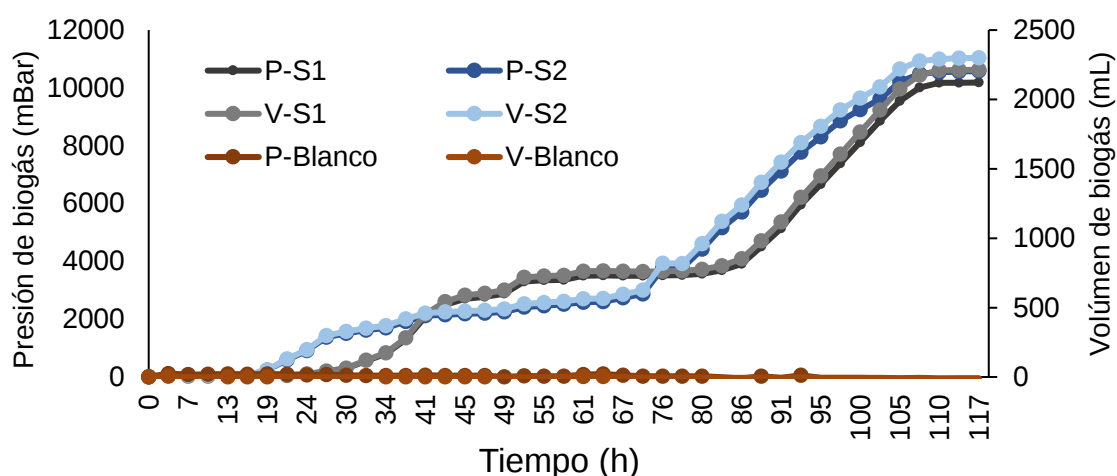


Figura 5.6. Volumen acumulado de biogás del Ensayo para estudiar el mejor pretratamiento

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se observa que los dos reactores tuvieron un comportamiento similar con promedio para presión máxima de biogás de 10.385 mBar y volumen máximo de biogás de 2.257 mL. Al comparar este resultado con el volumen máximo que se obtuvo utilizando vinaza como sustrato (580 mL), se evidencia que con sacarosa la producción es 4 veces mayor. La prevalencia de la sacarosa sobre la vinaza es el resultado esperado, sin embargo, al presentar una diferencia tan grande se podría considerar estudios adicionales sobre pretratamientos aplicados a la vinaza para incrementar la producción de hidrógeno.

5.4.1 Variables de Gompertz

Se determinaron las variables cinéticas de Gompertz en los reactores que utilizaron como sustrato sacarosa. Los valores se presentan en la Tabla 5.7 y los

datos de volumen con los que se realizó el análisis se encuentran registrados en el Anexo 2, Tabla 9.9.

Tabla 5.7. Parámetros de Gompertz para el Ensayo de PBH con pretratamiento H_2SO_4 -6 horas a pH 2 y sacarosa

Reactor	$\lambda(\text{h})$	$R_m(\text{mL/h})$	$P(\text{mL})$
S1	34,64	24,41	3.124
S2	37,94	29,01	3.134
Blanco	-	-	-

S: sacarosa

Los resultados obtenidos con el Blanco no permitieron describir el modelo de Gompertz, razón por la cual fueron descartados del análisis. Es importante anotar, que debido a que al reactor Blanco no se le adicionó sustrato, este presentó el comportamiento esperado, es decir valores casi nulos de generación de biogás. Por esta razón la generación de biogás se atribuye únicamente a la degradación del sustrato.

Durante este ensayo se obtuvieron valores promedio para P , R_m superiores a los alcanzados con vinaza, el cual era el resultado esperado debido a que la sacarosa es un sustrato de fácil asimilación y esto favorece la producción de biogás en procesos de fermentación (Ghimire et al., 2015). El valor obtenido para λ es mayor al obtenido durante el ensayo con vinaza, esto se debe al comportamiento de la curva de generación de biogás para el ensayo con sacarosa, en donde se presentan dos fases exponenciales mediadas por un periodo de estabilidad.

5.4.2 Composición de biogás

En la Tabla 5.8 se presentan los valores de composición de biogás para cada reactor. Al igual que en el ensayo con vinaza, en este ensayo no se produjo metano. Sin embargo, la fracción de hidrógeno para la fermentación de sacarosa (0,7 mol H_2 /mol biogás) fue mayor que para la fermentación de vinaza (0,47 mol H_2 /mol biogás). Esto se atribuye a posibles problemas de toxicidad relacionados con el contenido de potasio y sulfatos presentes en la vinaza (Searmsirimongkol et al., 2011).

Tabla 5.8. Composición de biogás para reactores con mayor volumen máximo durante Ensayo de PBH para estudiar el pre tratamiento óptimo.

ID. De reactor	Volumen de biogás (mL)	Fracción molar de Biogás (mol/mol Biogás)		
		H ₂	CH ₄	CO ₂
S1	2.214	0,70	0,00	0,30
S2	2.300	0,71	0,00	0,29

5.4.3 Eficiencia de producción de H₂

La eficiencia se determina de la misma manera que se hizo para el ensayo con vinaza, utilizando los datos registrados en el Anexo 1 . Tabla 9.2. En la Tabla 5.9 se presentan los resultados.

Tabla 5.9. Eficiencia de producción de H₂ para la fermentación de sacarosa

Tratamiento	H ₂ generado (mol/L)	Glucosa consumida (mol/L)	Eficiencia de generación de H ₂ (mol H ₂ / mol glucosa)
S	0,1768	0,0537	3,3

La eficiencia alcanzada con sacarosa (3,3 mol H₂/mol glucosa), es un valor alto comparado con lo obtenido en estudios donde utilizaron el mismo sustrato (glucosa o sacarosa). Chang et al. (2011) reportaron una eficiencia de 1,51 mol H₂/mol glucosa; Zhu y Béland (2006) de 1,55 mol H₂/mol glucosa; Lamaison et al. (2015), quienes utilizaron un inóculo que también proviene de un reactor UASB, obtuvieron una eficiencia de 2,21 mol H₂/mol glucosa. Adicionalmente, dos Reis et al. (2015) alcanzaron una eficiencia máxima de 3,54 mol H₂/mol glucosa utilizando como sustrato una mezcla de 25% vinaza y 75% glucosa.

La eficiencia obtenida con sacarosa fue 3 veces mayor que con vinaza. Teniendo en cuenta que la vinaza es un residuo agroindustrial, con potencial para la generación de hidrogeno biológico, es necesario expandir el campo de investigación en pretratamientos y condiciones operacionales que potencien su eficiencia.

6 CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados del estudio, se puede afirmar que el tiempo de exposición influyó significativamente en la generación de biogás. El tiempo que proporcionó un mayor PBH fue **6 horas**, ya que los reactores inoculados con lodo pretratado por 6 horas presentaron mayor producción de biogás que con 24 horas. Así mismo, en el análisis de las variables de Gompertz se concluye que con un tiempo de exposición de 6 horas se presentó una tasa de producción de biogás (39,32 mL/h) y un volumen de biogás (370,08 mL) mayores que con 24 horas. Por otra parte, el periodo de latencia no se vio afectado por ninguno de los factores evaluados.

A partir del análisis de interacción de los factores, se determinó que todas las interacciones tienen significancia en el PBH del inóculo pretratado. Sin embargo, la interacción que presentó mayor significancia fue **RQ*pH**, debido a que el efecto del reactivo químico sobre la producción de biogás dependió del pH al cual fue sometido el inóculo, ya que la mayor producción de biogás a pH 2 se obtuvo con H_2SO_4 , y a pH 3 se obtuvo con HCl.

El pH que proporcionó mayor PBH de inóculo pretratado fue pH 2, porque según el análisis de interacciones, con pH 2 se presentó más generación de biogás que con pH 3. Adicionalmente, en el análisis de composición de biogás se determinó que la fracción de hidrógeno para los tratamientos con pH 2 fue 0,44 mol H_2 /mol biogás y con pH 3 fue 0,42 mol H_2 /mol biogás.

Teniendo en cuenta los resultados del ANOVA y del análisis de composición de biogás, se estableció que el H_2SO_4 fue el reactivo químico que proporcionó mayor PBH. El volumen de biogás generado por los reactores con inóculo pretratado con H_2SO_4 fue mayor que con HCl. La fracción de hidrógeno fue de 0,48 mol H_2 /mol de biogás y 0,38 mol H_2 /mol de biogás para H_2SO_4 y HCl respectivamente.

El pretratamiento con H_2SO_4 , pH 2 y 6 horas fue el que proporcionó mayor PBH, con una eficiencia de 0,77 mol H_2 /mol glucosa y la mayor generación de hidrógeno (0,0303 mol H_2 /L_{sustrato}).

La vinaza demostró ser un sustrato viable para la producción de hidrógeno, ya que la eficiencia máxima alcanzada utilizando vinaza como sustrato (0,77 mol H_2 /mol glucosa), se encuentra en el rango de los valores típicos en producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura de residuos agroindustriales.

Respecto a la fermentación de sacarosa, al aplicar el tratamiento que proporcionó mayor PBH, se obtuvo una generación de hidrógeno de 0,1768 mol H_2 /L y una eficiencia de 3,3 mol H_2 /mol glucosa, con una fracción de hidrógeno de 0,71 mol H_2 /mol Biogás. Lo que indica que el PBH del inóculo puede aumentar o disminuir dependiendo del sustrato al cual se encuentre sometido.

Todos los pretratamientos implementados fueron eficaces en la eliminación de las arqueas metanogénicas, ya que no hubo presencia de metano en las muestras de biogás.

En cuanto a la dinámica de la curva de producción de biogás, se presentaron comportamientos similares a los observados en la curva teórica para generación de biogás, en donde se distinguen las fases de periodo de latencia, generación exponencial y estabilización. Sin embargo, no se determinan de forma general estas fases, debido a que varían dependiendo de la condición de pretratamiento.

7 RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones que involucren la generación de hidrógeno a través de la fermentación oscura con vinaza como sustrato, con el fin de optimizar los procesos, tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

Con la finalidad de proporcionar estabilidad al proceso y evitar que variables ajenas a los factores experimentales evaluados, puedan generar variaciones en los resultados, procurar una agitación uniforme en todos los reactores. Así mismo, evaluar y determinar una velocidad de agitación media que permita tanto el contacto del lodo con el sustrato, así como la conservación de los gránulos en el lodo que pueden favorecer los procesos de fermentación oscura.

Se recomienda mantener en agitación el reactor en el que se realice la adaptación del inóculo con la finalidad de adaptar el lodo en condiciones similares a las que será expuesto durante el montaje experimental. Esto puede contribuir también a disminuir el tiempo de adaptación al fomentar el contacto lodo-sustrato.

Al realizar la liberación de biogás, se recomienda utilizar una aguja pequeña con la intención de disminuir la velocidad de salida del gas. Ya que al utilizar agujas más grandes se puede generar espuma, la cual ocupa la cabeza de aire del reactor y afecta la operación del mismo.

8 BIBLIOGRAFÍA

- ALBANEZ, R., LOVATO, G., ZAIAT, M., RATUSZNEI, S. M. y RODRIGUES, J. A. D. 2016. Optimization, metabolic pathways modeling and scale-up estimative of an AnSBBR applied to biohydrogen production by co-digestion of vinasse and molasses. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 20473-20484.
- AMORIM, E. L. C., BARROS, A. R., DAMIANOVIC, M. H. R. Z., SILVA E. L., 2009. Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. . *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2), 783-790.
- APHA, A. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. *WEF*, 21, 258-259.
- ARGUN, H. y KARGI, F. 2009. Effects of sludge pre-treatment method on bio-hydrogen production by dark fermentation of waste ground wheat. *international journal of hydrogen energy*, 34, 8543-8548.
- ARGUN, H., KARGI, F., KAPDAN, I. K. y 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.
- ASSAWAMONGKHOLSIRI, T., REUNGSANG, A. y PATTRA, S. 2013. Effect of acid, heat and combined acid-heat pretreatments of anaerobic sludge on hydrogen production by anaerobic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 6146-6153.
- BAEK, S.-C. y KWON, Y.-J. 2007. *Optimization of the pretreatment of rice straw hemicellulosic hydrolyzates for microbial production of xylitol*.
- BAGHCHEHSARAE, B., NAKHLA, G., KARAMANEV, D. y MARGARITIS, A. 2011. Revivability of fermentative hydrogen producing bioreactors. *international journal of hydrogen energy*, 36, 2086-2092.
- BARCA, C., SORIC, A., RANAVA, D., GIUDICI-ORTICONI, M.-T. y FERRASSE, J.-H. 2015. Anaerobic biofilm reactors for dark fermentative hydrogen production from wastewater: A review. *Bioresource technology*, 185, 386-398.
- BARRIOS, J. 2015. *Influencia del pH sobre la producción biológica de hidrógeno a partir de agua residual agroindustrial*. Tesis de grado, Universidad del Valle. Cali, Colombia.
- BECKERS, L., HILIGSMANN, S., LAMBERT, S. D., HEINRICHS, B. y THONART, P. 2013. Improving effect of metal and oxide nanoparticles encapsulated in porous silica on fermentative biohydrogen production by *Clostridium butyricum*. *Bioresource technology*, 133, 109-117.
- BEDOYA, A., CASTRILLON, J. C., RAMIREZ, J. E., VASQUEZ, J. E. y ARIAS ZABALA, M. 2008. Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte. *Dyna*, 75, 137-157.
- BISAILLON, A., TURCOT, J. y 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.

- BITRÓN, G. y CARVAJAL, C. 2010. Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 101, 9071-9077.
- BUNDHOO, M. A. Z. y MOHEE, R. 2016. Inhibition of dark fermentative biohydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 6713-6733.
- BUNDHOO, M. A. Z., MOHEE, R. y HASSAN, M. A. 2015. Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. *Journal of Environmental Management*, 157, 20-48.
- CARDENAS, C. D. 2019. *Efecto del pretratamiento térmico sobre la AHE como herramienta para la selección de inóculos en la fermentación oscura del agua residual del proceso de extracción de almidón de yuca*. Maestría en Ingeniería, Enf. Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Universidad del Valle.
- CARMINATO, V. M. B. 2013. *Influência do cálcio na produção biológica de hidrogênio a partir de águas residuárias em biorreatores anaeróbios*. Disertación de Maestría, Escola de Engenharia de São Carlos.
- CUI, M. y SHEN, J. 2012. Effects of acid and alkaline pretreatments on the biohydrogen production from grass by anaerobic dark fermentation. *international journal of hydrogen energy*, 37, 1120-1124.
- CHANG, J.-S., LEE, K.-S. y LIN, P.-J. 2002. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1167-1174.
- CHANG, S., LI, J.-Z. y LIU, F. 2011. Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. *Renewable Energy*, 36, 1517-1522.
- CHEN, C.-C., LIN, C.-Y. y LIN, M.-C. 2002. Acid-base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process. *Applied microbiology and biotechnology*, 58, 224.
- CHEN, Y., CHENG, J. J. y CREAMER, K. S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, 99, 4044-4064.
- CHENG, J., SU, H., ZHOU, J., SONG, W. y CEN, K. 2011. Hydrogen production by mixed bacteria through dark and photo fermentation. *international journal of hydrogen energy*, 36, 450-457.
- CHEONG, D.-Y. y HANSEN, C. L. 2006. Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. *Applied microbiology and biotechnology*, 72, 635-43.
- CHERNICHARO, C. 2007. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Reactores anaeróbios*, Brasil, Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. .
- CRISTOFOLETTI, C. A., ESCHER, J. P., CORREIA, J. E., MARINHO, J. F. U. y FONTANETTI, C. S. 2013. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. *Waste Management*, 33, 2752-2761.
- DE GIOANNIS, G., MUNTONI, A., POLETTINI, A. y POMI, R. 2013. A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. *Waste Management*, 33, 1345-1361.

- DE HOON, M. J. L., EICHENBERGER, P. y VITKUP, D. 2010. Hierarchical Evolution of the Bacterial Sporulation Network. *Current Biology*, 20, R735-R745.
- DEVLIN, D. C., ESTEVES, S. R. R., DINSDALE, R. M. y GUWY, A. J. 2011. The effect of acid pretreatment on the anaerobic digestion and dewatering of waste activated sludge. *Bioresource Technology*, 102, 4076-4082.
- DJALMA, N. F. J. A., WENZEL, J., ETCHEBEHERE, C. y ZAIAT, M. 2014. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, 16852-16862.
- DOMASHENKO, A., GOLOVCHENKO, A., GORBATSKY, Y., NELIDOV, V. y SKORODUMOV, B. 2002. Production, storage and transportation of liquid hydrogen. Experience of infrastructure development and operation. *International journal of hydrogen energy*, 27, 753-755.
- DOS REIS, C. M., CAROSIA, M. F., SAKAMOTO, I. K., AMÂNCIO VARESCHE, M. B. y SILVA, E. L. 2015. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40, 8498-8509.
- DUBOIS, M., GILLES, K., HAMILTON, J., REBERS, P. Y SMITH, F. 1956. *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*.
- ELBESHBISHY, E., DHAR, B. R., NAKHLA, G. y LEE, H.-S. 2017. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 656-668.
- ELSHARNOUBY, O., HAFEZ, H., NAKHLA, G. y EL NAGGAR, M. H. 2013. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 4945-4966.
- ESPAÑA, E., MIJANGOS, J., BARAHONA, L., DOMINGUEZ, J., HERNÁNDEZ G. y ALZATE, L. 2011. Vinasses: Characterization and Treatments. . *Waste Management & Research*, 29(12), pp. 1235-1250. .
- FAN, Y.-T., ZHANG, Y.-H., ZHANG, S.-F., HOU, H.-W. y REN, B.-Z. 2006. Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Bioresource Technology*, 97, 500-505.
- FAN, Y., LI, C., LAY, J.-J., HOU, H. y ZHANG, G. 2004. Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost. *Bioresource Technology*, 91, 189-193.
- FANG, H., ZHANG, T. y LIU, H. 2002. Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 112–118.
- FANGKUM, A. y REUNGSANG, A. 2011. Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: Effects of initial pH and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 8687-8696.
- FERNANDES, B. S., PEIXOTO, G., ALBRECHT, F. R., SAAVEDRA DEL AGUILA, N. K. y ZAIAT, M. 2010. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. *Energy for Sustainable Development*, 14, 143-148.
- FIELLD, J. 1987. *Medición de parametros: arranque y operación de sistemas de flujo ascendente con manto de lodo UASB*, Santiago de Cali, Universidad de Valle.

- FOSTER, S. J. y JOHNSTONE, K. 1990. Pulling the trigger: the mechanism of bacterial spore germination. *Molecular microbiology*, 4, 137-141.
- FRANKLIN, T. J. y SNOW, G. 1989. *Biochemistry of antimicrobial action. Second Edition.* , Londres, Inglaterra.
- GARCÍA-DEPRAECT, O. y LEÓN-BECERRIL, E. 2018. Fermentative biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate-acetate pathway: Operational performance, kinetic analysis and microbial ecology. *Fuel*, 234, 151-160.
- GARCÍA-DEPRAECT, O., RENE, E. R., GÓMEZ-ROMERO, J., LÓPEZ-LÓPEZ, A. y LEÓN-BECERRIL, E. 2019. Enhanced biohydrogen production from the dark co-fermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Novel insights into ecological regulation by pH. *Fuel*, 253, 159-166.
- GHIMIRE, A., FRUNZO, L., PIROZZI, F., TRABLY, E., ESCUDIE, R., LENS, P. N. L. y ESPOSITO, G. 2015. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73-95.
- GIACHINI, C. F. y FERRAZ, M. V. 2009. Benefícios da utilização de vinhaça em terras de plantio de cana-de-açúcar-revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Agronomia*, 3, 1-15.
- GONZÁLEZ-GIL, R., CHAMORRO-BURGOS, I., HERRERA, C., LARRUBIA, M. A., LABORDE, M., MARIÑO, F. y ALEMANY, L. J. 2015. Production of hydrogen by catalytic steam reforming of oxygenated model compounds on Ni-modified supported catalysts. Simulation and experimental study. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40, 11217-11227.
- GONZÁLEZ-PASTOR, J. E., HOBBS, E. C. y LOSICK, R. 2003. Cannibalism by Sporulating Bacteria. *Science*, 301, 510.
- GUO, X. M., TRABLY, E., LATRILLE, E., CARRÈRE, H. y STEYER, J.-P. 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 10660-10673.
- GUYOT, J., GUTIERREZ, G. Y ROJAS, M. 1993. Anaerobic microbial counts of different potential anaerobic inocula. . *Applied microbiology and biotechnology*, 40, 139-142.
- HALLENBECK, P. C. 2009. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7379-7389.
- HALLENBECK, P. C. 2012. *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production*, Springer Science+Business Media, LLC, New York.
- HALLENBECK, P. C. y BENEMANN, J. R. 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1185-1193.
- HANNON, K. y TRENKLE, A. 1990. Evaluation of condensed molasses fermentation solubles as a nonprotein nitrogen source for ruminants. *Journal of animal science*, 68, 2634-2641.
- HARUN, I., JAHIM, J. M., ANUAR, N. y HASSAN, O. 2012. Hydrogen production performance by *Enterobacter cloacae* KBH3 isolated from termite guts. *international journal of hydrogen energy*, 37, 15052-15061.
- HAWKES, F. R., HUSSY, I., KYAZZE, G., DINSDALE, R. y HAWKES, D. L. 2007. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora:

- Principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 172-184.
- HENRY, J. G., HEINKE, G. W., ESCALONA, H. J. y OTHERS 1999. *Ingeniería ambiental*, Pearson Educación.
- HOARAU, J., CARO, Y., GRONDIN, I. y PETIT, T. 2018. Sugarcane vinasse processing: Toward a status shift from waste to valuable resource. A review. *Journal of Water Process Engineering*, 24, 11-25.
- HU, B. y CHEN, S. 2007. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 3266-3273.
- HUANG, W., WANG, Z., ZHOU, Y. y NG, W. J. 2015. The role of hydrogenotrophic methanogens in an acidogenic reactor. *Chemosphere*, 140, 40-46.
- HURTADO, M. A. y MUÑOZ, D. M. 2014. Efecto del pre-tratamiento térmico de un inóculo en la producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura de glucosa.
- IDEAM. 2011. Guía para el manejo seguro y gestión ambiental de 25 sustancias químicas. Available from: <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018903/Links/Guia4.pdf>.
- INSTITUTO NACIONAL DE ELECTRICIDAD Y ENERGÍAS LIMPIAS 2009. La generación de energía eléctrica a partir de combustibles fósiles.
- INTERGOVERNAMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE 2014. Mitigation of climate change 2014.
- ÍÑIGUEZ-COVARRUBIAS, G. y PERAZA-LUNA, F. 2007. Reduction of solids and organic load concentrations in tequila vinasses using a polyacrylamide (PAM) polymer flocculant. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 23, 17-24.
- JUNGHARE, M., SUBUDHI, S. y LAL, B. 2012. Improvement of hydrogen production under decreased partial pressure by newly isolated alkaline tolerant anaerobe, *Clostridium butyricum* TM-9A: Optimization of process parameters. *international journal of hydrogen energy*, 37, 3160-3168.
- KALIL, M. S., ALSHIYAB, H.S., YUSOFF, W.M.W. 2008. Effect of nitrogen source and carbon to nitrogen ratio on hydrogen production using *C. acetobutylicum*(Article). *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4, 393-401.
- KAN, E. 2013. Effects of pretreatments of anaerobic sludge and culture conditions on hydrogen productivity in dark anaerobic fermentation. *Renewable energy*, 49, 227-231.
- KAPDAN, I. K. y KARGI, F. 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 569-582.
- KAPPELER, T. 1978. Microbial Degradation of the water soluble fraction of gas oil-I.
- KHAN, M. A., NGO, H. H., GUO, W., LIU, Y., ZHANG, X., GUO, J., CHANG, S. W., NGUYEN, D. D. y WANG, J. 2017. Biohydrogen production from anaerobic digestion and its potential as renewable energy. *Renewable Energy*.
- KHANAL, S. K. 2011. *Anaerobic biotechnology for bioenergy production: principles and applications*, John Wiley & Sons.

- KHANAL, S. K., CHEN, W.-H., LI, L. y SUNG, S. 2004. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International journal of hydrogen energy*, 29, 1123-1131.
- KLOBUTCHER, L. A., RAGKOUSI, K. y SETLOW, P. 2006. The *Bacillus subtilis* spore coat provides "eat resistance" during phagocytic predation by the protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 165-170.
- KOSKINEN, P. E. P., KAKSONEN, A. H. y PUHAKKA, J. A. 2007. The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidised-bed bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 97, 742-758.
- KRUPP, M. y WIDMANN, R. 2009. Biohydrogen production by dark fermentation: Experiences of continuous operation in large lab scale. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 4509-4516.
- KRYSTEVA, M., LALOV, I. y BESCHKOV, V. 2010. Acceleration and increase of hydrogen production by simultaneous fermentation of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides* on wine-vinasse substrate. *Bulg. Chem. Commun.*, 42, 46-50.
- KUMARI, S. y DAS, D. 2017. Improvement of biohydrogen production using acidogenic culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 4083-4094.
- LAABERKI, M.-H. y DWORKIN, J. 2008. Role of Spore Coat Proteins in the Resistance of *Bacillus subtilis* Spores to *Caenorhabditis elegans* Predation. *Journal of Bacteriology*, 190, 6197.
- LAMAISON, F. D. C., MAIA DE ANDRADE, P. A., BIGATON, A. D., ANDREOTE, F. D., ANTÔNIO, R. V. y REGINATTO, V. 2015. Long-term effect of acid and heat pretreatment of sludge from a sugarcane vinasse treatment plant on the microbial community and on thermophilic biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40, 14124-14133.
- LAY, C.-H., LIN, H.-C., SEN, B., CHU, C.-Y. y LIN, C.-Y. 2012. Simultaneous hydrogen and ethanol production from sweet potato via dark fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 27, 155-164.
- LAY, J.-J., FAN, K.-S., HWANG JIENG, I., CHANG JAMES, I. y HSU, P.-C. 2005. Factors Affecting Hydrogen Production from Food Wastes by *Clostridium*-Rich Composts. *Journal of Environmental Engineering*, 131, 595-602.
- LAY, J.-J., LEE, Y.-J. y NOIKE, T. 1999. Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Research*, 33, 2579-2586.
- LAZARO, C. Z., PERNA, V., ETCHEBEHERE, C. y VARESCHE, M. B. A. 2014. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, 6407-6418.
- LEE, H.-S., SALERNO, M. B. y RITTMANN, B. E. 2008. Thermodynamic Evaluation on H₂ Production in Glucose Fermentation. *Environmental Science & Technology*, 42, 2401-2407.

- LEE, K.-S., LIN, P.-J. y CHANG, J.-S. 2006. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 465-472.
- LEE, K., WU, J., LO, Y., LO, Y., LIN, P. Y CHANG, J. 2004. Anaerobic hydrogen production with an efficient carrier-induced granular sludge bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 87, 648-657.
- LEE, M.-J., SONG, J.-H. y HWANG, S.-J. 2009. Effects of acid pre-treatment on bio-hydrogen production and microbial communities during dark fermentation. *Bioresource technology*, 100, 1491-1493.
- LI, C. y FANG, H. H. P. 2007. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37, 1-39.
- LIN, C. Y. y LAY, C. H. 2004. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 41-45.
- LIU, C.-Z. y CHENG, X.-Y. 2010. Improved hydrogen production via thermophilic fermentation of corn stover by microwave-assisted acid pretreatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 8945-8952.
- LIU, G. y 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.
- LOPEZ-VAZQUEZ, C. M., MÉNDEZ, G. B., CARRILLO, F. J. C. y GARCÍA, H. A. H. 2017. *Tratamiento biológico de aguas residuales: principios, modelación y diseño*, IWA Publishing.
- ŁUKAJTIS, R., HOŁOWACZ, I., KUCHARSKA, K., GLINKA, M., RYBARCZYK, P., PRZYJAZNY, A. y KAMIŃSKI, M. 2018. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 665-694.
- LUO, G., XIE, L., ZOU, Z., WANG, W. y ZHOU, Q. 2010a. Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. *Bioresource technology*, 101, 959-964.
- LUO, G., XIE, L., ZOU, Z., WANG, W., ZHOU, Q. y SHIM, H. 2010b. Anaerobic treatment of cassava stillage for hydrogen and methane production in continuously stirred tank reactor (CSTR) under high organic loading rate (OLR). *International journal of hydrogen energy*, 35, 11733-11737.
- MACIZO, M. 2007. La desinfección del agua con cloro. *Universidad politécnica de Cataluña. España*.
- MAINTINGUER, S. I., FERNANDES, B. S., DUARTE, I. C. S., SAAVEDRA, N. K., ADORNO, M. A. T. y VARESCHE, M. B. 2008. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4309-4317.
- MARQUES, P., BARTOLOMEU, M., TOMÉ, M. Y NEVES, L. 2009. Bio-hydrogen production from glycerol by a strain of *Enterobacter aerogenes*.
- MISHRA, J., KHURANA, S., KUMAR, N., GHOSH, A. K. y DAS, D. 2004. Molecular cloning, characterization, and overexpression of a novel [Fe]-hydrogenase isolated from a high rate of hydrogen producing *Enterobacter*

- cloacae IIT-BT 08. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324, 679-685.
- MOHAMMADI, P., IBRAHIM, S., MOHAMAD ANNUAR, M. S. y LAW, S. 2011. Effects of different pretreatment methods on anaerobic mixed microflora for hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent. *Journal of Cleaner Production*, 19, 1654-1658.
- MOHAN, S. V. 2009. Harnessing of biohydrogen from wastewater treatment using mixed fermentative consortia: process evaluation towards optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7460-7474.
- MOOSBRUGGER, R. E., WENTZEL, M. C., EKAMA, G. A. y MARAIS, G. V. R. 1993. Weak acid/bases and pH control in anaerobic systems-A review. *WATER SA-PRETORIA*, 19, 1-1.
- MORAES, B. S., ZAIAT, M. y BONOMI, A. 2015. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable energy reviews*, 44, 888-903.
- MORIMOTO, M., ATSUKO, M., ATIF, A. A. Y., NGAN, M. A., FAKHRU'L-RAZI, A., IYUKE, S. E. y BAKIR, A. M. 2004. Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 709-713.
- MU, Y., YANG, H.-Y., WANG, Y.-Z., HE, C.-S., ZHAO, Q.-B., WANG, Y. y YU, H.-Q. 2014. The maximum specific hydrogen-producing activity of anaerobic mixed cultures: definition and determination. *Scientific Reports*, 4, 5239.
- MU, Y., YU, H.-Q. y WANG, G. 2007. Evaluation of three methods for enriching H₂-producing cultures from anaerobic sludge. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 947-953.
- MU, Y., ZHENG, X.-J., YU, H.-Q. y ZHU, R.-F. 2006. Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 780-785.
- NANDI, R. y SENGUPTA, S. 1998. Microbial Production of Hydrogen: An Overview. *Critical Reviews in Microbiology*, 24, 61-84.
- NATH, K. y DAS, D. 2004. Improvement of fermentative hydrogen production: Various approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 520-529.
- NATIONS, F. A. A. O. O. T. U. 2019. FAOSTAT Crops Sugarcane-Colombia.
- NICHOLSON, W. L., MUNAKATA, N., HORNECK, G., MELOSH, H. J. y SETLOW, P. 2000. Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 548.
- NOIKE, T., TAKABATAKE, H., MIZUNO, O. y OHBA, M. 2002. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *International journal of hydrogen energy*, 27, 1367-1371.
- NORLI, I., HO, Y., FISCHER, K., KRANERT, M. y BOLEY, A. Biodegradability Assessment of Bio-flocculant via Anaerobic and Aerobic Test. International Conference on Environment Science and Engineering (ICESE), Bali, Indonesia, 2011.
- O-THONG, S., PRASERTSAN, P., INTRASUNGKHA, N., DHAMWICHUKORN, S. y BIRKELAND, N.-K. 2008. Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill

- effluent by Thermoanaerobacterium-rich sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1221-1231.
- OH, S.-E., VAN GINKEL, S. y LOGAN, B. E. 2003. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environmental science & technology*, 37, 5186-5190.
- OH, Y.-K., KIM, S. H., KIM, M.-S. y PARK, S. 2004. Thermophilic biohydrogen production from glucose with trickling biofilter. *Biotechnology and Bioengineering*, 88, 690-698.
- ORTIGUEIRA, J., ALVES, L., GOUVEIA, L. y MOURA, P. 2015. Third generation biohydrogen production by *Clostridium butyricum* and adapted mixed cultures from *Scenedesmus obliquus* microalga biomass. *Fuel*, 153, 128-134.
- PAN, C.-M., MA, H.-C., FAN, Y.-T. y HOU, H.-W. 2011. Bioaugmented cellulosic hydrogen production from cornstalk by integrating dilute acid-enzyme hydrolysis and dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 4852-4862.
- PANAGIOTOPOULOS, I. A., BAKKER, R. R., DE VRIJE, T., CLAASSEN, P. A. M. y KOUKIOS, E. G. 2012. Dilute-acid pretreatment of barley straw for biological hydrogen production using *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 11727-11734.
- PARAJÓ, J. C., DOMINGUEZ, H. y DOMÍNGUEZ, J. M. 1997. Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 18-24.
- PATEL, A. K., DEBROY, A., SHARMA, S., SAINI, R., MATHUR, A., GUPTA, R. y TULI, D. K. 2015. Biohydrogen production from a novel alkalophilic isolate *Clostridium* sp. IODB-O3. *Bioresource technology*, 175, 291-297.
- PAWAR, S. S. y VAN NIEL, E. W. J. 2013. Thermophilic biohydrogen production: how far are we? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 7999-8009.
- PECORINI, I., BALDI, F. y IANNELLI, R. 2019. Biochemical Hydrogen Potential Tests Using Different Inocula. *Sustainability*, 11.
- PENDYALA, B., CHAGANTI, S. R., LALMAN, J. A., SHANMUGAM, S. R., HEATH, D. D. y LAU, P. C. K. 2012. Pretreating mixed anaerobic communities from different sources: correlating the hydrogen yield with hydrogenase activity and microbial diversity. *international journal of hydrogen energy*, 37, 12175-12186.
- PÉREZ, A. 2007. *Optimización de un filtro anaerobio en escala real para el tratamiento de aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca*. Tesis Maestría, Universidad del Valle.
- PIRC, E., NOVOSEL, B. y BUKOVEC, P. 2012. Comparison of GC and OxiTop analysis of biogas composition produced by anaerobic digestion of glucose in cyanide inhibited systems. *Acta Chim. Slov*, 59, 398-404.
- PUIG, J. y COROMINAS, J. 1990. *La ruta de la energía*, Anthropos Editorial.
- RAFIEENIA, R., LAVAGNOLO, M. C. y PIVATO, A. 2017. Pre-treatment technologies for dark fermentative hydrogen production: Current advances and future directions. *Waste Management*.
- RAFRAFI, Y., TRABLY, E., HAMELIN, J., LATRILLE, E., MEYNIAL-SALLES, I., BENOMAR, S., GIUDICI-ORTICONI, M. T. y STEYER, J. P. 2013. Sub-

- dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 4975-4985.
- RAMIREZ, L. 1998. *Adecuación de una metodología para la evaluación de potenciales semillas para la inoculación de reactores anaerobios*. Tesis de maestría, Universidad del Valle. Cali, Colombia.
- REN, N.-Q., GUO, W.-Q., WANG, X.-J., XIANG, W.-S., LIU, B.-F., WANG, X.-Z., DING, J. y CHEN, Z.-B. 2008. Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4318-4324.
- ROJAS, M., FONSECA, S., SILVA, C., OLIVEIRA, V. y 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* (2015), 46-54.
- RORKE, D. y GUEGUIM KANA, E. B. 2016. Biohydrogen process development on waste sorghum (*Sorghum bicolor*) leaves: Optimization of saccharification, hydrogen production and preliminary scale up. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 12941-12952.
- SAADY, N. M. C. 2013. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 13172-13191.
- SALERNO, M. B., PARK, W., ZUO, Y. y LOGAN, B. E. 2006. Inhibition of biohydrogen production by ammonia. *Water Research*, 40, 1167-1172.
- SANTOS, S. C., ROSA, P. R. F., SAKAMOTO, I. K., AMÂNCIO VARESCHE, M. B. y SILVA, E. L. 2014. Hydrogen production from diluted and raw sugarcane vinasse under thermophilic anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, 9599-9610.
- SCHUT, G. J. y ADAMS, M. W. W. 2009. The Iron-Hydrogenase of *Thermotoga maritima* Utilizes Ferredoxin and NADH Synergistically: a New Perspective on Anaerobic Hydrogen Production. *Journal of Bacteriology*, 191, 4451.
- SEARMSIRIMONGKOL, P., RANGSUNVIGIT, P., LEETHOCHAWALIT, M. y CHAVADEJ, S. 2011. Hydrogen production from alcohol distillery wastewater containing high potassium and sulfate using an anaerobic sequencing batch reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 12810-12821.
- SETLOW, P. 2003. Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 550-556.
- SGOBBI, A., NIJS, W., DE MIGLIO, R., CHIODI, A., GARGIULO, M. y THIEL, C. 2016. How far away is hydrogen? Its role in the medium and long-term decarbonisation of the European energy system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 19-35.
- SHOW, K.-Y., LEE, D.-J. y CHANG, J.-S. 2011. Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresource technology*, 102, 8524-8533.
- SIKORA, A., BŁASZCZYK, M. L., JURKOWSKI, M. y ZIELENKIEWICZ, U. 2013. *Lactic acid bacteria in hydrogen-producing consortia: on purpose or by coincidence?*, INTECH open science open minds.

- SINGH, L. y WAHID, Z. A. 2015. Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 70-80.
- SINHA, P. y PANDEY, A. 2011. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 7460-7478.
- SÜEL, G. M., GARCIA-OJALVO, J., LIBERMAN, L. M. y ELOWITZ, M. B. 2006. An excitable gene regulatory circuit induces transient cellular differentiation. *Nature*, 440, 545.
- SYDNEY, E. B., NOVAK, A. C., ROSA, D., PEDRONI MEDEIROS, A. B., BRAR, S. K., LARROCHE, C. y SOCCOL, C. R. 2018. Screening and bioprospecting of anaerobic consortia for biohydrogen and volatile fatty acid production in a vinasse based medium through dark fermentation. *Process Biochemistry*, 67, 1-7.
- TAI, J., ADAV, S. S., SU, A. y LEE, D.-J. 2010. Biological hydrogen production from phenol-containing wastewater using *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 13345-13349.
- TIAN, Z., MOHAN, G. R., INGRAM, L. y PULLAMMANAPPALLIL, P. 2013. Anaerobic digestion for treatment of stillage from cellulosic bioethanol production. *Bioresource technology*, 144, 387-395.
- TREVISAN, V. 2010. *Proposta de metodologia para determinação da atividade hidrogênica específica*. Doutor em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- TREVISAN, V., MONTEGGIA, L. O. y DOS SANTOS DELABARY, H. 2015. Methodology to determine the specific hydrogenic activity (SHA) of waste sludges. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40, 9977-9981.
- TYAGI, V. K., ANGÉRIZ CAMPOY, R., ÁLVAREZ-GALLEGO, C. J. y ROMERO GARCÍA, L. I. 2014. Enhancement in hydrogen production by thermophilic anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste and sewage sludge – Optimization of treatment conditions. *Bioresource Technology*, 164, 408-415.
- UENO, Y., HARUTA, S., ISHII, M., IGARASHI, Y. 2001. Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 555-562.
- USON, U. D. S. 2013. *Capítulo 1: Generalidades sobre el cloro*.
- VALDEZ-VAZQUEZ, I. y POGGI-VARALDO, H. M. 2009. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and sustainable energy reviews*, 13, 1000-1013.
- VALENCIA, A. C. M. 2017. Crisis energética en Colombia. *Tecnología Investigación y Academia*, 4, 74-81.
- VAN GINKEL, S. SUNG, L. LI y LAY, J. J. 2001a. Role of initial sucrose and pH levels on natural, hydrogen—producing, anaerobe germination. *Proceedings of the 2001 DOE hydrogen program review NREL/CP-570-30535 (2001)*.
- VAN GINKEL, S., SUNG, S. y LAY, J.-J. 2001b. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science and Technology*, 35, 4726-4730.

- VEENING, J. W., SMITS, W. K., HAMOEN, L. W. y KUIPERS, O. P. 2006. Single cell analysis of gene expression patterns of competence development and initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* grown on chemically defined media. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 531-541.
- VLSSIDES, A., BARAMPOUTI, E. M., MAI, S., STAMATOGLU, A. y TSIMAS, E. 2010. Alternative biological systems for the treatment of vinasse from wine. *Water Science and Technology*, 62, 2899-2904.
- WANG, B., WAN, W. y WANG, J. 2009. Effect of ammonia concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *Bioresource Technology*, 100, 1211-1213.
- WANG, C.-H., LIN, P.-J. y CHANG, J.-S. 2006. Fermentative conversion of sucrose and pineapple waste into hydrogen gas in phosphate-buffered culture seeded with municipal sewage sludge. *Process Biochemistry*, 41, 1353-1358.
- WANG, C. Y. C., J. 2007. Continuous Biohydrogen Production from Starch with Granulated Mixed Bacterial Microflora. *Energy and Fuels*, 22, 93-97.
- WANG, J. y WAN, W. 2008a. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 2934-2941.
- WANG, J. y WAN, W. 2008b. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 5392-5397.
- WANG, J. y WAN, W. 2009. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 799-811.
- WANG, J. y YIN, Y. 2017. Principle and application of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 4804-4823.
- WANG, Z., SHAO, S., ZHANG, C., LU, D., MA, H. y REN, X. 2015. Pretreatment of vinegar residue and anaerobic sludge for enhanced hydrogen and methane production in the two-stage anaerobic system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40, 4494-4501.
- WONG, Y. M., WU, T. Y. y JUAN, J. C. 2014. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, 471-482.
- XING, Y., LI, Z., FAN, Y. y HOU, H. 2010. Biohydrogen production from dairy manures with acidification pretreatment by anaerobic fermentation. *Environmental Science and Pollution Research*, 17, 392-399.
- YANG, G., ZHANG, G. y WANG, H. 2015. Current state of sludge production, management, treatment and disposal in China. *Water research*, 78, 60-73.
- YELA, J. y PEÑA, L. C. 2015. *Influencia de la relación sustrato:lodo en la producción biológica de hidrógeno a partir de agua residual agroindustrial*. Tesis de grado, Universidad del Valle. Cali, Colombia.
- ZHANG, K., REN, N., GUO, C., WANG, A. y CAO, G. 2011. Effects of various pretreatment methods on mixed microflora to enhance biohydrogen production from corn stover hydrolysate. *Journal of Environmental Sciences*, 23, 1929-1936.

- ZHENG, X.-J. y YU, H.-Q. 2004. Roles of pH in biologic production of hydrogen and volatile fatty acids from glucose by enriched anaerobic cultures. *Applied biochemistry and biotechnology*, 112, 79-90.
- ZHU, H. y BÉLAND, M. 2006. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 1980-1988.

9 ANEXOS

9.1 Anexo 1

Tabla 9.1. Condiciones iniciales del experimento

Montaje	Tipo de pretratamiento			Trata- miento	Sustrato	Características del inóculo			pH del lodo pretratado	pH del lodo tras ptto	pH de ajuste ideal en el reactor
	RQ	T	pH			ST (mg/L)	SV (mg/L)	SV/ST			
Inóculo sin pretratamiento	-	-	-	-	Vinaza	107.285	73.645	0,69			
Ensayo de PBH para determinar el pretratamiento que genere mayor producción de biogás	HCl	24h	2	T1	Vinaza	116.635	74.725	0,64	1,76	5,33	5,3
	HCl	24h	3	T2	Vinaza	109.785	73.930	0,67	2,88	5,25	
	H ₂ SO ₄	24h	2	T3	Vinaza	128.575	77.075	0,60	1,84	5,35	
	H ₂ SO ₄	24h	3	T4	Vinaza	121.350	78.435	0,65	2,82	5,72	
	HCl	6h	2	T5	Vinaza	121.755	76.490	0,63	1,86	5,45	
	HCl	6h	3	T6	Vinaza	115.900	74.920	0,65	3,01	5,39	
	H ₂ SO ₄	6h	2	T7	Vinaza	133.925	86.135	0,64	1,93	5,35	
	H ₂ SO ₄	6h	3	T8	Vinaza	124.885	79.290	0,63	2,89	5,51	
Ensayo de PBH para estudiar el pretratamiento óptimo	H ₂ SO ₄	6h	2	S	Sacarosa	171.460	89.200	0,52	2,1	5,29	

Tabla 9.2. Características físico-químicas iniciales y finales del sobrenadante por reactor

Montaje	ID	pH		Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L)		DQO Total (mg O ₂ /L)	AGVs Totales (mg A.Acético/L)	Carbohidratos Totales (mg sacarosa/L)	
		Inicial	Final	Inicial	Final			Inicial	Final
Ensayo de PBH para determinar el pretratamiento que genere mayor producción de biogás	T1.1	5,3	4,4	235	256	47.356	11.262	12.259	5.964
	T1.2	5,3	4,7	235	141	45.800	11.309		5.272
	T1.3	5,3	4,9	235	2.146	50.467	8.928		8.994
	T2.1	5,3	4,5	235	543	44.022	11.253		5.521
	T2.2	5,3	4,9	235	1.569	44.356	9.021		5.633
	T2.3	5,3	4,9	235	1.566	49.911	9.812		7.550
	T3.1	5,3	4,8	235	1.208	44.800	9.849		4.292
	T3.2	5,3	4,7	235	1.292	51.356	11.411		7.001
	T3.3	5,3	5,0	235	1.763	46.356	10.174		6.742
	T4.1	5,3	4,5	235	525	52.244	11.978		7.262
	T4.2	5,3	5,1	235	0	51.244	10.100		7.736
	T4.3	5,3	4,6	235	892	-	11.848		5.630
	T5.1	5,3	4,6	235	730	45.244	10.593		6.626
	T5.2	5,3	4,9	235	1.586	42.133	9.226		6.206
	T5.3	5,3	4,8	235	1.563	42.467	10.583		5.252
	T6.1	5,3	4,7	235	1.355	42.578	11.672		5.603
	T6.2	5,3	4,7	235	1.285	43.800	9.309		5.968
	T6.3	5,3	4,8	235	1.818	44.467	9.458		4.997
	T7.1	5,3	4,8	235	1.517	43.022	10.146		5.487
	T7.2	5,3	4,9	235	1.552	43.578	9.960		5.269
	T7.3	5,3	5,0	235	1.760	42.911	9.281		5.819
	T8.1	5,3	4,5	235	614	43.578	11.346		2.405
	T8.2	5,3	4,7	235	1.401	44.356	11.058		5.319
	T8.3	5,3	4,9	235	1.679	44.244	9.179		6.991
Ensayo de PBH para estudiar el pretratamiento óptimo	S1	4,7	3,6	43	0	10.039	2.468	9.656	159
	S2	4,5	3,6	43	0	8.413	2.201		749
	S3	4,7	3,7	43	0	8.265	2.096		2.196

9.2 Anexo 2

Tabla 9.3. Comportamiento de las presiones en el ensayo de PBH para evaluación de los pretratamientos

Tiempo (h)	Presiones (mBar)																							
	T1.1	T1.2	T1.3	T2.1	T2.2	T2.3	T3.1	T3.2	T3.3	T4.1	T4.2	T4.3	T5.1	T5.2	T5.3	T6.1	T6.2	T6.3	T7.1	T7.2	T7.3	T8.1	T8.2	T8.3
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	16	19	45	19	38	50	20	35	26	14	37	0	18	40	10	0	4	46	0	19	16	18	18	27
11	0	7	43	11	40	55	7	22	12	5	42	0	0	44	0	9	47	58	0	15	13	0	19	38
15	0 16	0	42	23	106	103	5	10	6	0	34	-18	0	40	-13	-5	32	106	-5	9	5	-8	9	37
18	-38	-22	19	16	330	136	-10	0	-13	-11	-	-45	-30	17	-45	-12	15	95	-7	-19	-29	-39	0	46
21	52	-36	8	47	643	541	-15	0	-31	-15	14	-63	-37	0	-49	-7	17	368	0	-20	-44	-49	50	290
23	-55	-40	9	107	896	851	-10	0	-30	-11	65	-66	-41	0	-54	0	270	366	5	-25	-47	-50	147	398
25	-65	-44	13	176	1.298	1.352	0	26	-24	-8	93	-64	-33	59	-51	25	314	471	73	-8	-45	-40	343	568
27	-57	-51	23	213	1.370	1.438	5	87	-19	0	148	-49	-33	152	-50	75	591	563	187	52	-36	-18	546	850
29	-60	-51	120	244	1.386	1.400	8	197	-11	0	268	-23	-37	388	-53	143	829	625	399	285	-41	-9	870	1.197
32	-71	-64	159	270	1.388	1.540	-8	307	0	0	622	43	-29	574	48	209	1.107	616	604	630	30	30	1.339	1.157
34	-69	-62	464	302	1.394	1.537	0	375	40	0	966	36	-12	1.023	11	201	1.333	710	812	1.277	224	54	1.590	1.019
36	-64	-49	530	330	1.392	1.525	28	470	137	7	1.305	56	0	1.382	132	168	1.309	745	790	1.884	584	62	1.650	1.063
40	-54	-8	527	370	1.397	1.536	31	761	333	10	1.408	62	41	1.478	632	195	1.248	791	1.211	2.207	1.759	113	1.948	1.002
43	-58	23	505	370	1.383	1.524	27	1.004	375	0	1.400	43	55	1.483	1.192	202	1.288	873	1.164	2.332	2.481	129	1.925	969
45	-71	25	480	253	1.373	1.518	24	1.244	375	5	1.392	0	63	1.587	1.535	199	1.284	824	1.101	2.322	2.523	148	1.897	960
49	-81	25	634	288	1.527	1.500	17	1.238	547	49	1.572	0	63	1.623	1.867	229	1.284	857	1.165	2.331	2.762	132	1.970	990
51	-82	30	634	307	1.516	1.529	87	1.249	549	55	1.580	0	75	1.654	1.946	224	1.399	824	1.287	2.474	2.735	135	1.908	978
53	-86	40	626	289	1.516	1.518	58	1.254	525	46	1.546	0	63	1.679	1.957	204	1.339	842	1.197	2.436	2.717	134	1.861	987
56	-90	43	625	288	1.494	1.511	62	1.258	514	48	1.527	0	63	1.691	1.946	199	1.351	824	1.170	2.416	2.711	172	1.832	993
58	-85	42	623	334	1.492	1.518	50	1.352	516	45	1.525	-52	47	1.688	1.971	215	1.320	837	1.275	2.477	2.729	148	1.811	990
60	-81	46	615	334	1.485	1.508	36	1.367	513	36	1.521	0	52	1.697	1.931	217	1.310	829	1.297	2.515	2.719	148	1.802	984
64	-78	54	625	339	1.484	1.507	24	1.397	518	60	1.532	0	48	1.701	1.920	199	1.291	824	1.304	2.454	2.714	137	1.813	995
87	-90	70	604	253	1.403	1.505	-54	1.383	382	18	1.458	0	63	1.654	1.920	303	1.263	792	1.301	2.632	2.702	173	1.736	990

Tabla 9.4. Comportamiento de las presiones en el ensayo de PBH del pre tratamiento óptimo - H₂SO₄, pH2, 6h

Tiempo (h)	Presiones (mBar)			
	S1	S2	S3	Blanco
0	0	0	0	0
4,4	43	60	49	25
6,9	28	57	45	18
10,6	26	58	47	20
13,4	24	54	44	22
15,5	23	58	48	20
18,7	36	241	156	22
20,9	50	593	523	19
23,9	98	911	921	15
27,8	191	1.376	1.430	17
30,2	295	1.506	1.565	13
32,3	557	1.615	1.673	9
34,4	799	1.703	1.751	10
36,6	1.294	1.922	1.949	10
40,9	2.089	2.117	2.169	12
42,8	2.494	2.153	2.199	10
44,9	2.705	2.184	2.284	10
46,7	2.770	2.206	2.338	10
48,8	2.877	2.253	2.384	0
51,9	3.302	2.422	2.660	7
54,5	3.349	2.461	2.704	5
58,2	3.363	2.513	2.830	6
61,2	3.507	2.588	3.055	17
62,6	3.516	2.609	3.136	22
66,9	3.507	2.739	3.592	12
69,2	3.499	2.875	3.850	6
75,9	3.509	3.769	5.596	6
77,9	3.519	3.764	5.596	6
80,3	3.566	4.418	6.303	6
83	3.686	5.160	7.111	-1
85,6	3.915	5.706	7.447	-11
88,5	4.514	6.452	7.856	6
91	5.144	7.127	0	-5
93,2	5.958	7.770	0	13
95,3	6.670	8.309	0	-5
97,9	7.390	8.854	0	-6
99,8	8.123	9.248	0	-6
102	8.856	9.615	0	-9
104,5	9.550	10.208	0	-13
107,4	10.012	10.482	0	-9
109,7	10.172	10.542	0	-20
112,3	10.180	10.568	0	-18
116,7	10.186	10.583	0	-17

Tabla 9.5. Comportamiento del volúmen de biogás en el ensayo de PBH para evaluación de los pretratamientos

Tiempo (h)	Volumen acumulado (mL)																							
	T1.1	T1.2	T1.3	T2.1	T2.2	T2.3	T3.1	T3.2	T3.3	T4.1	T4.2	T4.3	T5.1	T5.2	T5.3	T6.1	T6.2	T6.3	T7.1	T7.2	T7.3	T8.1	T8.2	T8.3
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	3	4	10	4	8	11	4	8	6	3	8	0	4	9	2	0	1	10	0	4	3	4	4	6
11	0	2	9	2	9	12	2	5	3	1	9	0	0	10	0	2	10	13	0	3	3	0	4	8
15	-3	0	9	5	23	22	1	2	1	0	7	-4	0	9	-3	-1	7	23	-1	2	1	-2	2	8
18	-8	-5	4	3	72	30	-2	0	-3	-2	0	-10	-7	4	-10	-3	3	21	-2	-4	-6	-8	0	10
21	-11	-8	2	10	140	118	-3	0	-7	-3	3	-14	-8	0	-11	-2	4	80	0	-4	-10	-11	11	63
23	-12	-9	2	23	195	185	-2	0	-7	-2	14	-14	-9	0	-12	0	59	80	1	-5	-10	-11	32	86
25	-14	-10	3	38	282	294	0	6	-5	-2	20	-14	-7	13	-11	5	68	102	16	-2	-10	-9	75	123
27	-12	-11	5	46	298	312	1	19	-4	0	32	-11	-7	33	-11	16	128	122	41	11	-8	-4	119	185
29	-13	-11	26	53	301	304	2	43	-2	0	58	-5	-8	84	-12	31	180	136	87	62	-9	-2	189	260
32	-15	-14	35	59	302	335	-2	67	0	0	135	9	-6	125	10	45	241	134	131	137	7	7	291	251
34	-15	-13	101	66	303	334	0	81	9	0	210	8	-3	222	2	44	290	154	176	278	49	12	346	221
36	-14	-11	115	72	303	331	6	102	30	2	284	12	0	300	29	37	284	162	172	409	127	13	359	231
40	-12	-2	115	80	304	334	7	165	72	2	306	13	9	321	137	42	271	172	263	480	382	25	423	218
43	-13	5	110	80	301	331	6	218	81	0	304	9	12	322	259	44	280	190	253	507	539	28	418	211
45	-15	5	104	55	298	330	5	270	81	1	303	0	14	345	334	43	279	179	239	505	548	32	412	209
49	-18	5	138	63	332	326	4	269	119	11	342	0	14	353	406	50	279	186	253	507	600	29	428	215
51	-18	7	138	67	329	332	19	271	119	12	343	0	16	359	423	49	304	179	280	538	594	29	415	213
53	-19	9	136	63	329	330	13	273	114	10	336	0	14	365	425	44	291	183	260	529	590	29	404	214
56	-20	9	136	63	325	328	13	273	112	10	332	0	14	367	423	43	294	179	254	525	589	37	398	216
58	-18	9	135	73	324	330	11	294	112	10	331	-11	10	367	428	47	287	182	277	538	593	32	394	215
60	-18	10	134	73	323	328	8	297	111	8	331	0	11	369	420	47	285	180	282	547	591	32	392	214
64	-17	12	136	74	322	327	5	304	113	13	333	0	10	370	417	43	281	179	283	533	590	30	394	216
87	-20	15	131	55	305	327	-12	301	83	4	317	0	14	359	417	66	274	172	283	572	587	38	377	215

Tabla 9.6. Comportamiento del volúmen de biogás en el ensayo de PBH para estudiar el pre tratamiento óptimo - H_2SO_4 , pH2, 6h

Tiempo registro (h)	S1	S2	S3
0,0	0	0	0
4,4	9	13	11
6,9	6	12	10
10,6	6	13	10
13,4	5	12	10
15,5	5	13	10
18,7	8	52	34
20,9	11	129	114
23,9	21	198	200
27,8	42	299	311
30,2	64	327	340
32,3	121	351	364
34,4	174	370	381
36,6	281	418	424
40,9	454	460	471
42,8	542	468	478
44,9	588	475	496
46,7	602	479	508
48,8	625	490	518,1
51,9	718	526	578
54,5	728	535	588
58,2	731	546	615
61,2	762	562	664
62,6	764	567	681
66,9	762	595	781
69,2	760	625	837
75,9	763	819	1.216
77,9	765	818	1.216
80,3	775	960	1.370
83,0	801	1.121	1.545
85,6	851	1.240	1.618
88,5	981	1.402	1.707
91,0	1.118	1.549	-
93,2	1.295	1.689	-
95,3	1.449	1.806	-
97,9	1.606	1.924	-
99,8	1.765	2.010	-
102,0	1.925	2.089	-
104,5	2.075	2.218	-
107,4	2.176	2.278	-
109,7	2.211	2.291	-
112,3	2.212	2.297	-
116,7	2.214	2.300	-

Tabla 9.7. Composición de biogás en el ensayo de PBH para evaluación de los pretratamientos y en el ensayo de PBH para estudiar el pre tratamiento óptimo - H_2SO_4 , pH2, 6h

ID. Reactor	Fracción molar de Biogás (moles/mol Total)		
	%H ₂	%CH ₄	%CO ₂
T2.2	36%	0,00	64%
T2.3	35%	0,00	65%
T5.2	42%	0,00	58%
T5.3	40%	0,00	60%
T7.2	54%	0,00	46%
T7.3	40%	0,00	60%
T8.2	26%	0,00	74%
T8.3	72%	0,00	28%
S1	70%	0,00	30%
S2	71%	0,00	29%

Tabla 9.8. Cálculo para determinación de eficiencia de generación de hidrógeno por mol de glucosa

Reactor	Concentración Inicial (mg sacarosa/L)	Concentración Final (mg sacarosa/L)	Masa Removida (mg sacarosa/L)	Moles removidas (mol sacarosa/L)	Moles removidas (mol glucosa/L)	Fracción molar (mol H ₂ /mol Total)	Presión (mBar)	mol H ₂ / L sustrato	(mol H ₂ /mol Sacarosa)	(mol H ₂ /mol Glucosa)	Promedio
T2.2	12.259	5.633	6.626	0,0194	0,0387	0,35	1.403	0,0119	0,6147	0,3073	0,288
T2.3	12.259	5.521	6.738	0,0197	0,0394	0,29	1.505	0,0106	0,5372	0,2686	
T5.2	12.259	6.206	6.053	0,0177	0,0354	0,42	1.654	0,0168	0,9519	0,4759	
T5.3	12.259	5.252	7.007	0,0205	0,0409	0,40	1.920	0,0186	0,9091	0,4546	0,465
T7.2	12.259	5.269	6.990	0,0204	0,0408	0,54	2.632	0,0344	1,6865	0,8432	
T7.3	12.259	5.819	6.440	0,0188	0,0376	0,40	2.702	0,0262	1,3919	0,6960	
T8.2	12.259	5.319	6.940	0,0203	0,0406	0,26	1.736	0,0109	0,5394	0,2697	0,415
T8.3	12.259	6.991	5.268	0,0154	0,0308	0,72	990	0,0173	1,1222	0,5611	
S1	9.656	160	9.496	0,0277	0,0554	0,70	10.186	0,1728	6,2373	3,1187	
S2	9.656	749	8.907	0,0260	0,0520	0,71	10.583	0,1808	6,9534	3,4767	3,298

9.3 Anexo 3

Tabla 9.9. Análisis de Varianza de Modelo linear general: P(mL) vs Factores y combinaciones

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Reactivo químico	1	6.130	6.130	0,46	0,520
Tiempo de exposición	1	98.020	98.020	7,33	0,030
pH	1	13.863	13.863	1,04	0,342
Reactivo químico*Tiempo de exposición	1	22.637	22.637	1,69	0,234
Reactivo químico*pH	1	21.825	21.825	1,63	0,242
Tiempo de exposición*pH	1	68.744	68.744	5,14	0,058
Reactivo químico*Tiempo de exposición*pH	1	4.182	4.182	0,31	0,593
Error	7	93.597	13.371		
Total	14	331.624			

Tabla 9.10. Análisis de Varianza de Modelo linear general: Rm(mL/h) vs Factores y combinaciones

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Reactivo químico	1	165,42	165,42	1,59	0,248
Tiempo de exposición	1	1.058,13	1.058,13	10,14	0,015
pH	1	81,94	81,94	0,79	0,405
Reactivo químico*Tiempo de exposición	1	793,73	793,73	7,61	0,028
Reactivo químico*pH	1	172,08	172,08	1,65	0,240
Tiempo de exposición*pH	1	1.647,54	1.647,54	15,79	0,005
Reactivo químico*Tiempo de exposición*pH	1	0,06	0,06	0,00	0,982
Error	7	730,29	104,33		
Total	14	4.849,69			

Tabla 9.11. Análisis de Varianza de Modelo lineal general: $\lambda(h)$ vs Factores y combinaciones

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Reactivo químico	1	148,80	148,80	3,80	0,092
Tiempo de exposición	1	17,77	17,77	0,45	0,522
pH	1	195,89	195,89	5,00	0,060
Reactivo químico*Tiempo de exposición	1	78,18	78,18	2,00	0,201
Reactivo químico*pH	1	92,12	92,12	2,35	0,169
Tiempo de exposición*pH	1	74,52	74,52	1,90	0,210
Reactivo químico*Tiempo de exposición*pH	1	36,48	36,48	0,93	0,367
Error	7	274,24	39,18		
Total	14	997,16			