



COORDINACIÓN DE DESARROLLO PROFESIONAL E INSTITUCIONAL

SUBCOORDINACIÓN DE POSGRADO

TESIS

EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE ARRANQUE DE FILTROS ANAEROBIOS DE FLUJO ASCENDENTE EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE VINAZA TEQUILERA

que para obtener el grado de
Maestro en
Ciencias y Tecnología del Agua

presenta
Ian Joshua Robles Benítez

Tutor: Dra. Tania Gutiérrez Macías
Cotutor: Dra. Liliana García Sánchez

Jiutepec, Morelos

2021





Con fundamento en los artículos 21 y 27 de la Ley Federal del Derecho de Autor y como titular de los derechos moral y patrimoniales de la obra titulada “EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ARRANQUE DE FILTROS ANAEROBIOS DE FLUJO ASCENDENTE EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE VINAZA TEQUILERA”, otorgo de manera gratuita y permanente al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, autorización para que fijen la obra en cualquier medio, incluido el electrónico, y la divulguen entre su personal, estudiantes o terceras personas, sin que pueda percibir por tal divulgación una contraprestación.

NOMBRE Y DEL ESTUDIANTE

Ian Joshua Robles Benítez

Jiutepec, Mor. a 27 de marzo de 2021



MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DEL AGUA

Ante el Jurado integrado por:

Presidente: Dra. Petia Mijaylova Nacheva

Secretario: Dra. Liliana García Sánchez

Vocal 1: Dra. Tania Gutierrez Macias

Vocal 2: Dr. Juan Gabriel García Maldonado

Vocal 3: Dr. Edson Baltazar Estrada Arriaga

Tutor de tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Tania Gutierrez Macias', written over a light blue rectangular background.

Dra. Tania Gutierrez Macias

Jiutepec, Morelos a 27 de Marzo de 2021
Instituto Mexicano de Tecnología de Agua

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA), por brindarme el acceso a la institución y sus instalaciones, así como darme las facilidades para poder llevar a cabo este trabajo.

A la subordinación de posgrado del IMTA, por darme la oportunidad de ser parte de la primera generación adscrita al Programa Nacional de Posgrados de Calidad, por el apoyo y las facilidades brindadas durante toda mi estancia en el programa.

A la Lic. Belem Arroyo Ramírez y la Lic. María Elena Rivero Bustos, por toda su amabilidad, servicialidad, paciencia, apoyo e incluso palabras de aliento a lo largo de estos dos años.

A la Dra. Tania Gutierrez Macias, por darme la oportunidad de volver a trabajar y colaborar con ella. Por hacerme parte de esta novedosa investigación y por los resultados obtenidos. Por su asesoría y profesionalismo para conmigo y el proyecto; y por compartir su conocimiento y enseñanzas.

A la Dra. Liliana García Sánchez, gracias por su apoyo y asesoría en mi investigación, por su tiempo invertido, por guiarme y darme la pauta; por todas sus aportaciones y por compartir sus conocimientos y consejos.

A la Dra. Petia Mijaylova Nacheva, el Dr. Edson Baltazar Estrada Arriaga y el Dr. Juan Gabriel García Maldonado, por todas sus observaciones, aportaciones y conocimientos brindados para enriquecer este trabajo.

A la ITA Yael Estefania Najera Arroyo, por su enseñanza, capacitación y asesoría en la técnica de DBO_5 y en el uso del cromatógrafo de gases, que fue primordial para el desarrollo de mi experimentación.

Al ITA Agustín Juárez, por su apoyo en las pruebas preliminares del experimento; al Ing. Juan de Dios, por su gran apoyo y colaboración en el arranque y la primera etapa del experimento; y al Ing. Alfonso Patricio, por su gran apoyo en la última etapa del experimento. Gracias a los tres por su esfuerzo, dedicación y entusiasmo que le brindaron a este proyecto.

A la M. C. Andrea García Díaz y al M. I. Josué Rafael García Ramón, por su apoyo, solidaridad y grata convivencia en el laboratorio de la planta piloto.

DEDICATORIAS

A ti, que nunca me dejaste caer, que me levantabas el ánimo cuando sentía que ya no podía, que siempre tenías las palabras adecuadas para motivarme, seguir adelante y llenarme de seguridad. E incluso, cuando no tenías las palabras, siempre me esperaban tus brazos para refugiarme e inundarme de paz. A ti, que estuviste desde el comienzo, creyendo en mí como nadie más lo hizo. A ti, mi fuente de inspiración diaria, la alegría y motor de mi vida, el centro de mi universo; esto es por y para ti. Por aguantar mi impuntualidad por salir tarde de laboratorio, por soportar tantos mensajes sin contestar, por aguantar mi mal humor y escuchar mis quejas después de un día difícil o pesado, y, no obstante, recibirme con un plato de comida calentita. También, por celebrar mis victorias y emocionarte incluso más que yo, siempre siendo la más orgullosa de mí. Por ayudarme con mis artículos, en laboratorio, ayudarme a prepararme para mis presentaciones o exámenes; y siempre cuestionarme cosas interesantes, ayudándome a mejorar y estar más preparado. En fin, son incontables las cosas y sentimientos que nunca terminaría de agradecerte por todo (y solo hablando de mi etapa de maestría). Por siempre estar para mí cuando te necesité, y por seguir aquí a mi lado, a cada paso. Porque nadie más lo merece tanto como tú, mi amor; por tantísimo amor, paciencia y felicidad: ¡ARIGATO GOZAIMASU! TE AMO INFINITAMENTE, con todo lo que soy y todo lo que llegaré a ser, Flacuchi 愛.

A mis padres, por aguantarme dos años más en la casa. Por darme las herramientas necesarias y siempre apoyar mis decisiones. Por sus consejos y ánimos. Por siempre apoyarme y estar para mí. Por darme todo lo mejor desde antes de nacer y durante 24 años, e inculcarme sus valores. Por forjar la persona que soy. Los amo muchísimo, mil gracias, por tanto.

Al chaval, mi krnal, mi bro, mi hermano. Gracias por siempre hacerme reír con tus ocurrencias y memes. Gracias por siempre echarme porras y creer en mí. Por ayudarme a desestresarme jugando basquet y por esas cenas en platos elegantes. Por último, por darme la dicha de verte crecer, sobre todo en estos últimos dos años, llenándome de orgullo por ser tu hermano. Gracias por todo, Piporro. Sos un crack, ¡Te amo!

A mis abuelos y mis abuelitos, por ser mis segundos padres, por siempre preocuparse por mí, cuidarme, aconsejarme y nunca dejarme solo; siempre tratando de darme lo mejor, aunque a veces no lo mereciera. Los amo muchísimo, gracias por todo.

A mis suegros, por todo su apoyo y consejos, por incluirme y quererme como si fuera de su propia familia, abriéndome las puertas de su hogar, su mesa, trabajo y todo lo que una familia te puede ofrecer. Por confiar y creer en mí, por alegrarse de mis logros. Gracias por todo, son mi segunda familia, los quiero mucho.

Por último y nuevamente, a la Dra. Tania. Mil gracias por todo su apoyo, usted sabe todo lo que hizo por mí. Gracias por su confianza, su paciencia y su tiempo. Gracias por darme esta oportunidad y ayudarme a crecer tanto profesional como personalmente. Gracias por estos cuatro años trabajando juntos, fue un placer y una dicha.

A todos ustedes, que estuvieron conmigo durante más de 2 años de trabajo, les dedico este logro.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE ECUACIONES	VI
RESUMEN	VII
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades.....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	2
1.3 Justificación.....	2
1.3 Objetivos	4
1.4.1 <i>Objetivo general</i>	4
1.4.2 <i>Objetivos específicos</i>	4
1.4 Hipótesis.....	4
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 El tequila	5
2.2 Proceso de producción del tequila.....	6
2.3 Subproductos de la elaboración del tequila	6
2.3.1 <i>Bagazo de agave</i>	7
2.3.2 <i>Vinaza tequilera</i>	7
2.4 Métodos fisicoquímicos.....	9
2.5 Métodos biológicos	11
2.5.1 <i>Digestión aerobia</i>	11
2.5.2 <i>Digestión anaerobia</i>	11
2.6 Fases de la digestión anaerobia	12
2.6.1 <i>Hidrólisis</i>	13
2.6.2 <i>Acidogénesis</i>	13
2.6.3 <i>Acetogénesis</i>	14
2.6.4 <i>Metanogénesis</i>	14
2.7 Fermentación oscura	15
2.8 Factores importantes en la fermentación oscura	16
2.8.1 <i>Inóculo</i>	16
2.8.2 <i>Sustrato</i>	17
2.8.3 <i>Temperatura</i>	17
2.8.4 <i>Potencial de hidrógeno (pH)</i>	18
2.8.5 <i>Potencial de óxido-reducción (ORP)</i>	18
2.8.6 <i>Producción de biogás</i>	18
2.9 Clasificación de los reactores anaerobios	18
2.9.1 <i>Reactores de primera generación</i>	19
2.9.2 <i>Reactores de segunda generación</i>	19
2.9.3 <i>Reactores de tercera generación</i>	19
2.9.4 <i>Reactores de régimen batch</i>	19
2.9.5 <i>Reactores de régimen semi-continuo y continuo</i>	20
2.10 Clasificación de la biomasa	21

2.10.1 Biomasa floculenta	21
2.10.2 Biomasa granular	21
2.10.3 Biomasa fija (biopelícula).....	21
2.11 Cinética de degradación de materia orgánica	22
2.11.1 Modelo de Stover-Kincannon	23
CAPÍTULO 3. ANTECEDENTES	25
CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA.....	33
4.1 Etapa 1: Caracterización de la vinaza y la biomasa de estudio	33
4.2 Etapa 2: Instalación del sistema experimental e inoculación de los filtros	34
4.3 Etapa 3: Estabilización de los sistemas en régimen batch	38
4.4 Etapa 4: Pruebas experimentales en régimen continuo	39
4.4.1 Análisis del biogás	41
4.4.2 Análisis de nutrientes	41
4.4.3 Análisis de gases	41
4.5 Etapa 5: Cálculo de parámetros de respuesta y análisis estadístico	42
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	45
5.1 Caracterización de la vinaza.....	45
5.2 Operación y monitoreo de los filtros durante la etapa de estabilización	46
5.2.1 Carga orgánica volumétrica (COV)	46
5.2.2 pH	47
5.2.3 Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	48
5.2.4 Producción y composición del biogás	50
5.2.5 Nitrógeno amoniacal (N-NH ₃)	53
5.3 Operación y monitoreo de los filtros durante la etapa de las pruebas experimentales	54
5.3.1 pH monitoreo en continuo	54
5.3.2 ORP	55
5.3.3 Oxígeno disuelto (OD)	55
5.3.4 DQO monitoreo en continuo	56
5.3.5 Demanda Biológica de Oxígeno (DBO ₅).....	58
5.3.6 Carbohidratos.....	59
5.3.7 Producción y composición del biogás en continuo.....	61
5.3.8 Tasa de producción de hidrógeno (TPH) y rendimiento de hidrógeno (RH)	65
5.3.9 N-NH ₃ monitoreo en continuo	68
5.3.10 Sulfuros	68
5.3.11 Alcalinidad y AGV	69
5.3.12 Análisis estadístico	72
5.3.13 Coeficientes cinéticos de degradación de materia orgánica	75
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	78
CAPÍTULO 7. RECOMENDACIONES.....	79
ANEXO 1. Curvas de calibración para la determinación de composición del biogás	80
ANEXO 2. Análisis estadístico	81
ANEXO 3. Cinéticas de degradación comparativas.....	92
Referencias bibliográficas	94

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Diferentes tipos de reactores anaerobios (Fernández-Polanco y Seghezzo, 2015).....</i>	19
<i>Tabla 2. Formas de biomasa en los reactores anaerobios.....</i>	22
<i>Tabla 3. Resumen de antecedentes.....</i>	32
<i>Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos evaluados en la caracterización de la vinaza tequilera.</i>	33
<i>Tabla 5. Revisión bibliográfica para selección del método de pretratamiento térmico de la biomasa</i>	36
<i>Tabla 6. Parámetros monitoreados durante la etapa experimental.....</i>	40
<i>Tabla 7. Parámetros operacionales evaluados.....</i>	40
<i>Tabla 8. Caracterización fisicoquímica de la vinaza tequilera empleada en la investigación.</i>	46
<i>Tabla 9. Resumen de los parámetros monitoreados y de respuesta durante la etapa de experimentación.....</i>	72
<i>Tabla 10. Resumen de los análisis estadísticos.....</i>	73
<i>Tabla 11. Coeficientes cinéticos determinados.....</i>	77

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Proceso de producción del tequila.....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 2. Destrozamiento y generación de vinazas</i>	<i>8</i>
<i>Figura 3. Proceso de digestión anaerobia (García, 2014)</i>	<i>13</i>
<i>Figura 4. Reacciones generales de la fermentación oscura (Albarrán, 2017).....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 5. Reactores con régimen a) batch; b) semi-continuo y/o continuo.</i>	<i>20</i>
<i>Figura 6. Formas de la biomasa anaerobia</i>	<i>22</i>
<i>Figura 7. Diseño del sistema experimental de manera individual.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 8. a) Cubo de poliuretano utilizado como medio de soporte para la biomasa en los reactores; b) Biomasa empleado en la investigación</i>	<i>35</i>
<i>Figura 9. a) LGA pretratado térmicamente; b) LGA molido después de pretratamiento; c) Tamices utilizados para la reducción de tamaño del LGA</i>	<i>37</i>
<i>Figura 10. Metodología implementada para la inoculación y/o arranque de los filtros</i>	<i>38</i>
<i>Figura 11. Filtros inoculados en etapa de estabilización</i>	<i>39</i>
<i>Figura 12. a) Bolsa Tedlar para la captura de biogás; b) Cromatógrafo de gases SRI 8610</i>	<i>41</i>
<i>Figura 13. COV utilizada en los filtros durante la etapa de estabilización</i>	<i>47</i>
<i>Figura 14. Comportamiento del pH en los filtros durante la etapa de estabilización</i>	<i>48</i>
<i>Figura 15. Comportamiento de la DQO en los tres filtros durante la etapa de estabilización</i>	<i>49</i>
<i>Figura 16. Eficiencia de remoción de DQO en los filtros durante la etapa de estabilización.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 17. Producción de biogás en los filtros durante la etapa de estabilización</i>	<i>51</i>
<i>Figura 18. Cromatogramas obtenidos en el análisis de la composición del biogás mediante cromatografía de gases para a) F1 y b) F2.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 19. Nitrógeno amoniacal en el influente y efluente de los filtros en la etapa de estabilización</i>	<i>53</i>
<i>Figura 20. Comportamiento del pH en los filtros durante la etapa experimental en continuo ...</i>	<i>54</i>
<i>Figura 21. Comportamiento del ORP en los filtros durante la etapa experimental en continuo .</i>	<i>55</i>
<i>Figura 22. Comportamiento del OD en los filtros durante la etapa experimental en continuo...</i>	<i>56</i>
<i>Figura 23. Comportamiento de la DQO durante la etapa de experimentación en continuo</i>	<i>57</i>
<i>Figura 24. Eficiencia de remoción de DQO en los filtros durante la etapa de experimentación en continuo.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 25. Comportamiento de la a) DBO₅ en el influente y efluente de los filtros; b) Remoción de DBO₅ en los filtros; durante la fase experimental.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 26. Comportamiento de la a) concentración de glucosa en el influente y efluente de los filtros; b) consumo de carbohidratos en los filtros; durante la fase experimental.....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 27. Producción de biogás de los filtros durante la etapa de experimentación en continuo</i>	<i>62</i>
<i>Figura 28. Composición del biogás producido durante la etapa experimental en continuo a) F1 (VC), b) F2 (ISP) y c) F3 (IPT)</i>	<i>64</i>
<i>Figura 29. CHB en los filtros durante la etapa experimental en continuo</i>	<i>65</i>
<i>Figura 30. a) TPH registrada; b) RH registrado; en los filtros durante la etapa experimental en continuo.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 31. Nitrógeno amoniacal en el influente y efluente de los filtros en la etapa de experimentación</i>	<i>68</i>

Figura 32. Sulfuros en el influente y efluente de los filtros durante la etapa experimental en continuo..... 69

Figura 33. Alcalinidad total en el efluente de los filtros durante la etapa de experimentación ... 70

Figura 34. a) AGV en el influente y efluente de los filtros en la etapa experimental; b) comparación de AGV vs CHB 71

Figura 35. Análisis de regresión lineal múltiple para a) CHB, b) TPH y c) RH..... 75

Figura 36. Cinéticas de degradación de materia orgánica en los filtros para TRH de a) 5 h; y b) 10 h 76

ÍNDICE DE ECUACIONES

<i>Ecuación 1. Reacción de biotransformación de glucosa en la fermentación (Blanco, 2013).....</i>	15
<i>Ecuación 2. Modelo cinético linealizado de Stover-Kincannon (Kumar, Bhunia y Roshan, 2014).</i>	23
<i>Ecuación 3. Fórmula para calcular la TPH.....</i>	42
<i>Ecuación 4. Fórmula para calcular el RH.....</i>	42
<i>Ecuación 5. Fórmula de los gases ideales.....</i>	43
<i>Ecuación 6. Fórmula para normalización de la producción de hidrógeno.....</i>	43

RESUMEN

La fermentación oscura ha emergido desde hace cuatro décadas como una alternativa de tratamiento para las vinazas tequileras, en la cual, a pH bajo (4.5-6.5), temperatura mesófila y TRH corto (<24 h), es generado biogás rico en hidrógeno como subproducto. El hidrógeno, al tener un poder calorífico mayor al del metano (2.4 veces), y no tener un impacto negativo en la atmósfera, convierte a la fermentación oscura en una tecnología innovadora y sustentable. Es por ello que en la presente investigación se evaluó la opción de modificar las condiciones de operación de digestión anaerobia a condiciones de fermentación oscura para la producción de hidrógeno a partir de vinaza tequilera en un Filtro Anaerobio de Flujo Ascendente (FAFA), además de evaluar la viabilidad del arranque de un FAFA en condiciones de fermentación oscura con y sin pretratamiento del inóculo. Así, con esta investigación se obtendrá información valiosa que podrá ser aplicada en PTAR (plantas de tratamiento de aguas residuales) generadoras de metano que deseen innovar su proceso para la obtención de hidrógeno.

Se evaluó las condiciones de arranque F1 (VC: Variación de condiciones de digestión anaerobia a fermentación oscura), F2 (ISP: Inoculación sin pretratamiento) y F3 (IPT: Inoculación con pretratamiento térmico); así como el TRH teórico (10 y 5 h) de tres FAFA para la producción de hidrógeno a partir de vinaza tequilera. Los resultados demostraron que la mejor condición de arranque para el contenido de hidrógeno en el biogás (CHB) y rendimiento de hidrógeno (RH) fue F1, obteniendo valores experimentales promedio de 75% y 1,364 NmL H₂·gDQO_{removida}⁻¹, respectivamente, mientras que para la tasa de producción de hidrógeno (TPH) fue F3, registrando 5.3 NL H₂·L⁻¹·d⁻¹; todos los parámetros obtenidos con TRH de 5 h. Los filtros alcanzaron altas remociones de DQO comparadas con otros autores, reportando 43 (F1), 38 (F2) y 57% (F3) con TRH de 10 h; y 29 (F1), 23 (F2) y 57% (F3) con TRH de 5 h.

Con un análisis estadístico se demostró que el mejor TRH teórico fue de 5 h, al obtener resultados entre 28 y 67% mejores que con 10 h. La condición de arranque F1 (VC) se eligió como la mejor, obteniendo (con TRH 5 h) CHB y RH mayores en comparación con F2 (ISP) y F3 (IPT). Esto representó un gran aporte a la investigación, ya que demostró la viabilidad de producir hidrógeno a partir de un FAFA en condiciones de digestión anaerobia, únicamente acidificando el influente para propiciar condiciones de fermentación oscura; lo que se traduce en grandes beneficios energéticos, económicos y ambientales para las PTAR inmersas.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

El agua es un recurso natural sin el cual es imposible que exista la vida en la Tierra, ya que es indispensable para que cualquier ser viviente sea capaz de realizar sus funciones metabólicas. El planeta Tierra está conformado de un 75% de agua en su totalidad, sin embargo, de este volumen total de agua, el 97.5% corresponde a agua salada; característica que no la hace apta para los seres vivos. El 2.5% restante es agua dulce, pero de esta fracción, el 1.73% no está disponible al encontrarse en glaciares, nieve, hielo, permafrost y aguas subterráneas; dejando únicamente el 0.77% del agua total en el mundo accesible para el ser humano como agua dulce en forma de lagos, ríos y humedales, misma que es aprovechada en las diferentes actividades y procesos productivos antropogénicos (CONAGUA, 2018).

El agua que está disponible para uso humano es empleada por los diferentes sectores de la población, ya sea en procesos productivos o simplemente en la realización de sus actividades diarias. Según estimaciones de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, por sus siglas en inglés), a nivel mundial y hasta el año 2018 se determinó que el sector que más agua utiliza es el agrícola (70%), mientras que el sector industrial emplea solo un 19%. Para el mismo año, específicamente en México, el sector que tuvo un mayor uso del agua fue el agrícola, con un 76%; seguido por el uso en abastecimiento público con un 14.4%, el cual incluye la totalidad del agua entregada a través de redes de agua potable, usuarios domésticos, industrias y servicios conectados a dichas redes; y, por último, el uso industrial con un 9.6%. Estos porcentajes corresponden a los usos concesionados consuntivos, que son los que extraen el recurso de su ubicación natural, lo utilizan para sus fines (industrias, agrícolas o domésticos) y luego lo vierten en un sitio diferente, reducido en cantidad y con una calidad distinta (CONAGUA, 2018), dejando cada vez menos disponible este recurso. El problema del uso del agua radica no solo en la explotación de este recurso, sino también en la falta de tecnologías o tratamientos rentables para tratar el agua o purificarla, ya que después de ser empleada en las diversas actividades o procesos de producción, adquiere una calidad distinta debido a los compuestos presentes y, una vez descargada al alcantarillado o cuerpos receptores, se convierte en lo que se denomina “agua residual”; la cual, dependiendo de la fuente de generación, se puede dividir en dos: agua residual industrial (proveniente de las actividades y procesos industriales) y agua residual doméstica o municipal (proveniente de las casas, oficinas, hoteles, etc.).

En el sector industrial existen diferentes rubros, tales como herramientas, materiales, fármacos, alimentos, bebidas, etc. Específicamente dentro de la categoría de bebidas, se encuentran las bebidas sin alcohol y las bebidas alcohólicas, y dentro de estas últimas, en el caso de México, uno de los productos que mejor representa al país, dentro y fuera del mismo, es el tequila (Macías, 2001). La producción del tequila ha tenido un constante crecimiento en las últimas cuatro décadas, logrando en el año 2019 una producción total de 351.7 millones de litros y una exportación del 70.1% de la producción total (CRT, 2020). Su alto posicionamiento en los mercados internacionales trae como resultado un alto beneficio económico tanto para las

industrias como para los productores de agave. Sin embargo, la producción de tequila también trae consigo una problemática ambiental a consecuencia de los residuos que se generan en las diferentes etapas de producción (jima, cocción, extracción de mieles, fermentación y destilación), los cuales son principalmente el bagazo y la vinaza (García, 2014).

1.2 Planteamiento del problema

Durante la elaboración del tequila, en la etapa de destilación del mosto fermentado para la producción de etanol, se genera como subproducto un tipo de agua residual; la cual es denominada como “vinaza tequilera”. Este residuo se produce en un orden de 12 a 15 litros de vinaza por litro de alcohol destilado (Retes, 2014; Robles y Villalobos, 2009; Travieso *et al.*, 2008) y se caracteriza principalmente por su alto contenido de materia orgánica (50-150 gDQO·L⁻¹), pH ácido (3-5 unidades) y altas temperaturas de descarga (70-90°C) (Becerra, 2014; García, 2014; Bernal *et al.*, 2012).

En el año 2019 se generaron entre 4,220 y 5,275 millones de litros de vinaza. Por otro lado, la CONAGUA reportó que durante el 2018 solo el 39% de las aguas industriales generadas en México recibieron un tratamiento antes de ser vertidas (CONAGUA, 2018), por lo que es bastante probable que millones de litros de vinazas tequileras sean vertidas sin previo tratamiento a cuerpos receptores, lo que presenta un incumplimiento a la NOM-001-SEMARNAT-1996 en materia de límites máximos permisibles (LMP) de contaminantes presentes en el agua residual. Cuando las vinazas son descargadas a cuerpos de agua, las altas concentraciones de materia orgánica y el color oscuro que poseen reducen la penetración de luz solar, provocando el decremento de la actividad fotosintética de organismos acuáticos. Esto a su vez, hace que la concentración de oxígeno disuelto en el agua disminuya considerablemente, ocasionando finalmente el deterioro de la calidad de la vida acuática y con ello la muerte de especies acuáticas (Íñiguez y Hernández, 2010).

Dada la problemática sobre este residuo, es imprescindible que antes de su vertido a cuerpos receptores se apliquen metodologías eficientes de tratamiento para eliminar o reducir la concentración de los contaminantes, y que, a su vez, brinden un beneficio económico-energético a las PTAR (Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales).

1.3 Justificación

El tratamiento de vinazas tequileras ha sido tema importante de estudio durante las últimas cuatro décadas. Actualmente se cuenta con diversas tecnologías para su tratamiento, que van desde los métodos fisicoquímicos hasta los métodos biológicos. Aunque algunos métodos fisicoquímicos han demostrado altas eficiencia en la remoción de contaminantes, éstos presentan altos costos de operación debido a los reactivos y equipos que se emplean.

Hoy en día, la digestión anaerobia es una de las tecnologías más probadas y usadas en el tratamiento de vinazas tequileras, debido a las ventajas técnicas y económicas que presenta (Houbron, Sandoval y Hernández, 2016; Lorenzo-Acosta *et al.*, 2015; Sosa, 2013; y Cabrera y Díaz, 2013). Este proceso resulta bastante atractivo, pues tiene la capacidad de tratar aguas residuales

con altas concentraciones de materia orgánica como las de las vinazas, generando al mismo tiempo bioproductos como el gas metano y el gas hidrógeno; dos combustibles de gran relevancia en el campo de las energías renovables.

Una variación de la digestión anaerobia estudiada a partir de hace algunos años es la denominada “digestión anaerobia interrumpida” o “fermentación oscura”, cuyo objetivo es lograr la producción de hidrógeno a través de la inhibición de la metanogénesis (última etapa de la digestión anaerobia donde se produce metano) y la adecuación de las condiciones para la activación y reproducción de bacterias acetogénicas, que son las encargadas de la producción fermentativa de hidrógeno. Esta tecnología suele tener una mayor complejidad en el monitoreo de los parámetros de campo y operación, por lo que es estudiada con menor frecuencia, sin embargo, el hidrógeno tiene un aporte calorífico ($122-142 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}$) 2.4 veces mayor en comparación al del metano ($50 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}$) (Buitrón y Carvajal, 2009; Blanco, 2013; y Guadarrama, 2017), además de que la emisión del hidrógeno a la atmósfera no genera impactos nocivos al ambiente, caso contrario del metano.

Es por ello que en la presente investigación se evaluó la opción de modificar las condiciones de operación de digestión anaerobia a condiciones de fermentación oscura para la producción de hidrógeno a partir de vinaza tequilera en un Filtro Anaerobio de Flujo Ascendente (FAFA), además de evaluar la viabilidad del arranque de un FAFA en condiciones de fermentación oscura con y sin pretratamiento del inóculo.

El medio de empaque utilizado en los filtros consistió en cubos de poliuretano (PU), los cuales son novedosos debido a su forma regular y a que poseen una mayor área superficial ($900 \text{ m}^2\cdot\text{m}^{-3}$) en comparación con los empaques de geometría irregular ($400 \text{ m}^2\cdot\text{m}^{-3}$), por lo cual, es importante su estudio en la producción de hidrógeno, ya que no se reportan estudios acerca de la producción de hidrógeno con este medio de empaque. Asimismo, en los trabajos ya publicados sobre fermentación oscura aún no se reporta la optimización del proceso, por lo que todavía existe un gran campo de estudio en este tema.

Con esta investigación se obtuvo información que permitirá tomar decisiones en el caso de que una PTAR generadora de metano requiera modificar su proceso hacia la producción de hidrógeno a partir de vinaza tequilera, o bien, para una PTAR nueva que también desee producir hidrógeno.

1.3 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de las condiciones de arranque de filtros anaerobios de flujo ascendente en la producción de hidrógeno vía fermentación oscura a partir de vinaza tequilera.

1.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar diferentes condiciones de arranque (cambio de condiciones de digestión anaerobia a fermentación oscura, inoculado sin pretratamiento e inoculado con pretratamiento térmico) en los filtros para la remoción de materia orgánica en régimen batch.
- Evaluar diferentes condiciones de arranque en los filtros para la producción de hidrógeno en régimen continuo.
- Evaluar el tiempo de retención hidráulico en dos niveles para la producción de hidrógeno en los filtros en régimen continuo.
- Determinar el tiempo de retención hidráulico y las condiciones de arranque óptimas para maximizar la producción de hidrógeno en un filtro anaerobio de flujo ascendente a partir de vinaza tequilera.
- Determinar los coeficientes cinéticos para la remoción de materia orgánica en los filtros.

1.4 Hipótesis

El cambio de las condiciones de operación de un filtro anaerobio de flujo ascendente metanogénico para propiciar la fermentación oscura permitirá lograr una alta producción de hidrógeno, siendo al menos dos de los tres parámetros de respuesta (contenido de hidrógeno en el biogás, tasa de producción de hidrógeno y rendimiento de hidrógeno) más altos en comparación con los obtenidos aplicando otros métodos de arranque (inoculación sin pretratamiento e inoculación con pretratamiento térmico).

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 El tequila

El tequila es un aguardiente originario y elaborado en el municipio de Tequila; una pequeña región ubicada en el estado de Jalisco, México. Esta bebida es producida a partir de la destilación del mosto fermentado obtenido del corazón de una planta conocida como “agave azul”. Dicho corazón de la planta se asemeja a una piña de gran tamaño y se le conoce también por el nombre de mezcal. La palabra tequila proviene del náhuatl, que quiere decir la casa de la luna (CRT, 2020).

Desde hace cientos de años, en donde mito y realidad se funden en el tiempo para convertirse en leyenda, han surgido diferentes relatos; en los que se explica el origen del tequila. Una de estas leyendas narra que, una noche, el dios del viento Quetzalcóatl, viajó al cielo para visitar a una joven virgen de nombre Mayahuel, y convencerla de bajar a la tierra para convertirse, juntos, en un árbol de dos ramas. Cuando la abuela de Mayahuel despertó y vio que ella ya no estaba, viajó a la tierra junto con un grupo de demonios para hallar a su nieta. Al encontrar el árbol donde se había unido la pareja, la abuela rompió las ramas y se las dio a los demonios para comer. Después de que la abuela se marchó, Quetzalcóatl, quien sobrevivió; rescató algunos de los restos del cuerpo de Mayahuel, los quemó y los enterró. De estos estolones, después de un tiempo, creció la primera planta de agave (Ibarra *et al.*, 2010). Un día un grupo de indígenas, al refugiarse de una tormenta, observaron cuando un rayo de gran fuerza cayó con estrépito sobre una planta de agave, desgajando la piña y, debido al calor del rayo, ésta ardió por unos segundos. Al cesar la lluvia, el viento llevó un asombroso aroma hacia los indígenas. Uno de ellos tomó un pedazo de la piña quemada y al probarlo, sintió un sabor dulce, por lo que lo compartió con el resto. Uno de ellos, olvidó el pedazo de piña por varios días y, al volver a su choza, se percató de que un nuevo aroma envolvía el ambiente. El indígena observó que del jugo de la piña brotaban pequeñas burbujas que formaban una espuma blanca espesa, apartó la espuma del líquido y al probarlo, se encontró con un sabor enriquecido y distinto. La bebida provocó cierta alegría en su cuerpo, provocando en él un cambio de personalidad; por lo que se le consideró a esta bebida, la cual hoy conocemos con el nombre de “tequila”, como un regalo de los dioses (La Ruta del Tequila, 2016; García, 2014).

De acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-006-SCFI-2012 se define al tequila como: “Bebida alcohólica regional obtenida por destilación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, en las instalaciones de la fábrica de un productor autorizado, la cual debe estar ubicada en el territorio comprendido en la declaración, derivados de las cabezas de agave de la especie *tequilana weber variedad azul*, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptibles los mostos de ser enriquecidos y mezclados conjuntamente en la formulación con otros azúcares hasta en una proporción no mayor de 49% de azúcares reductores totales expresados en unidades de masa, en los términos establecidos en la presente norma y en la inteligencia que no están permitidas las mezclas en frío. El tequila es un líquido que puede tener color, cuando sea madurado, abocado, o añadido de un color específico.”

2.2 Proceso de producción del tequila

La producción y comercialización del tequila en el 2019 fue de 351.7 millones de litros, con una exportación del 70.1% y un incremento anual en la producción del 12% (CRT, 2020). El proceso de producción del tequila dura entre siete y nueve años y da comienzo con la siembra del agave *tequilana weber variedad azul* (CRT, 2020). Después de aproximadamente siete años, el agave alcanza su madurez y se inicia con la cosecha, etapa nombrada como “jima”; en donde sus hojas o pencas son cortadas dejando únicamente el tallo, conocido como piña. Las piñas son ingresadas a hornos de mampostería o autoclaves a una temperatura entre 100 y 110°C por cuatro días (dos días con inyección de vapor y dos con inyección suspendida) para hidrolizar la inulina (polímero de fructosa y glucosa), carbohidrato principal en el agave; y así obtener azúcares simples (principalmente fructuosa). Esta etapa ayuda a disminuir el pH de 5.2 a 4.5 unidades y a dar una mejor consistencia a las piñas antes de pasar a la etapa de molienda y extracción de jugo, que es en donde, con una combinación de desgarradoras y un tren de molinos de rodillos, los jugos o mieles son separados y extraídos de las fibras de la piña (García, 2014). En la siguiente etapa llamada “formulación”, de acuerdo con la NOM-006-SCFI-2012, el fabricante puede elaborar dos categorías de tequila; las cuales son: tequila 100% de agave y tequila, respectivamente. De acuerdo con lo elegido, se procede al envío de las mieles a las tinas de fermentación, la adición de las levaduras (*Saccharomyces Cerevisiae*) y el ajuste del pH (3.8-4 unidades) y temperatura (30-38°C) óptimos para las levaduras; el resultado de esta operación es el mosto fresco, listo para comenzar la fermentación. En esta fase, que dura entre 22 y 24 horas, las levaduras transforman los azúcares presentes en los mostos, en alcohol etílico y dióxido de carbono; así como otros compuestos que le brindan al tequila su aroma y sabor característico. Posteriormente, se efectúa una doble destilación del mosto fermentado en alambiques o en torres continuas. La primera se denomina destrozamiento, en donde se consigue una concentración de alcohol entre el 25 y 45%; y en la segunda se enriquece el contenido alcohólico hasta el 55%, de acuerdo a la norma del tequila. La última etapa del proceso es la maduración, en la que, de acuerdo a la norma, se le designa al tequila un tiempo de maduración que va desde dos meses hasta tres años en contacto directo con la madera de recipientes de roble o encino, dependiendo del tipo de tequila al que se quiera llegar; los cuales son reposado, añejo o extra añejo (Ibarra *et al.*, 2010).

2.3 Subproductos de la elaboración del tequila

En el 2014, según cifras del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), la industria tequilera generó 55,295 empleos directos, siendo la segunda industria de bebidas alcohólicas en generar el mayor número de empleos en el país, solo por detrás de la industria cervecera (México, 2015), por lo cual, representa un pilar fundamental en la economía del país, no obstante, la producción del tequila también trae consigo una problemática ambiental, ya que en el proceso se generan distintos subproductos contaminantes; siendo el bagazo y las vinazas (Figura 1) los que cobran un mayor impacto al tener como destino final el suelo y los cuerpos de agua, considerados como elementos básicos de todo ecosistema.

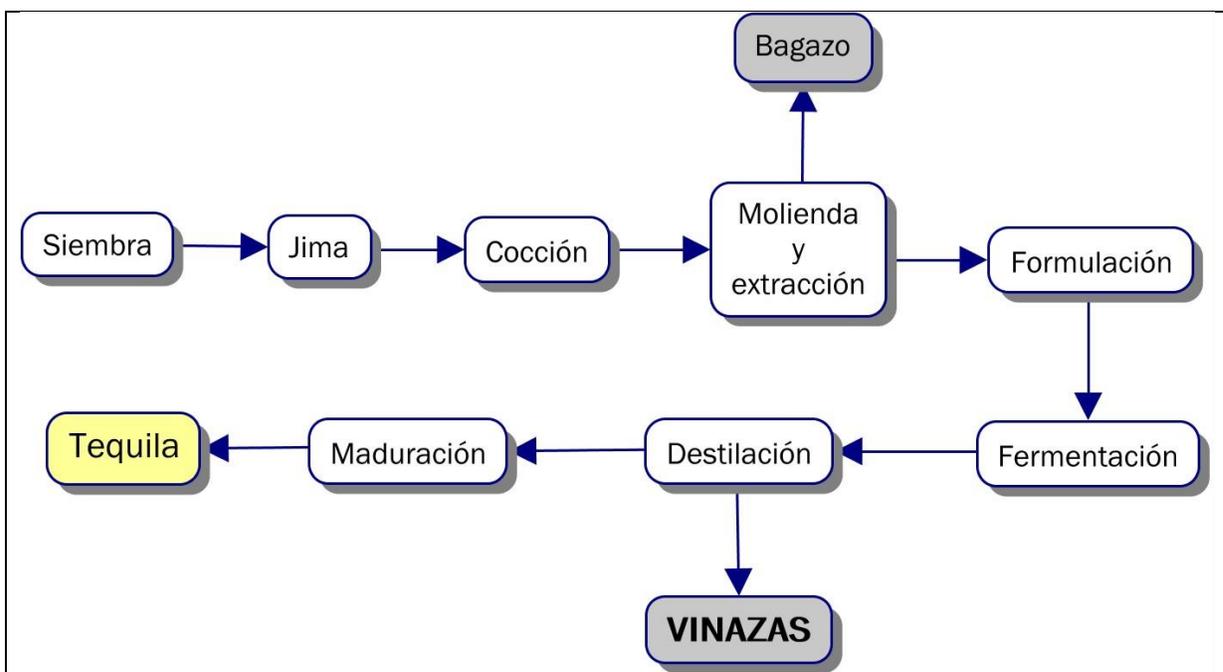


Figura 1. Proceso de producción del tequila

Se ha reportado que por cada litro de tequila que se produce se generan 1.4 Kg de bagazo y entre 12 y 15 L de vinazas (Ferral, 2015; García, 2014; Robles y Villalobos, 2009). De acuerdo con la producción de tequila registrada por el Consejo Regulador del Tequila (CRT) en 2018, se estima que se generaron alrededor de 432 millones de kilogramos de bagazo; y entre 3,709 y 4,636 millones de litros de vinaza. Estos subproductos poseen características fisicoquímicas superiores a los LMP establecidos en la normativa federal para la descarga de aguas residuales.

2.3.1 Bagazo de agave

El bagazo es la biomasa fibrosa que es desgarrada de las piñas de agave una vez que han pasado por la etapa de cocción y molienda para la extracción de mieles, y equivale aproximadamente al 40% del peso total en base húmeda de la piña (Martínez *et al.*, 2015). Este subproducto se compone de un 43% de celulosa, 19% hemicelulosa, 15% lignina, 10% de azúcares residuales, 3% nitrógeno total, 1% pectina y el 9% restante de otros compuestos (Abreu, 2013). Estas particularidades en su composición hacen que el bagazo de agave tenga múltiples aplicaciones y aprovechamientos, desde la elaboración de materiales de construcción, alimento para ganado y composta, hasta la elaboración de biocombustibles, bioplásticos, materia prima en la elaboración de papel, cartón y corcho, y obtención de enzimas; lo cual hace que su impacto ambiental se vea reducido (CyD, 2017; El Universal, 2017; Arriaga, 2006).

2.3.2 Vinaza tequilera

La palabra “vinaza” proviene del latín “*vinaceus*”, que significa “residuos del vino”. Las vinazas tequileras son el subproducto líquido que se genera en el destrozamiento (primera destilación) del mosto fermentado de agave. En la Figura 2 se muestra la generación de vinazas en la etapa

del destrozamiento para la obtención del ordinario (producto principal de la primera destilación), el cuál debe pasar posteriormente a la rectificación (segunda destilación).

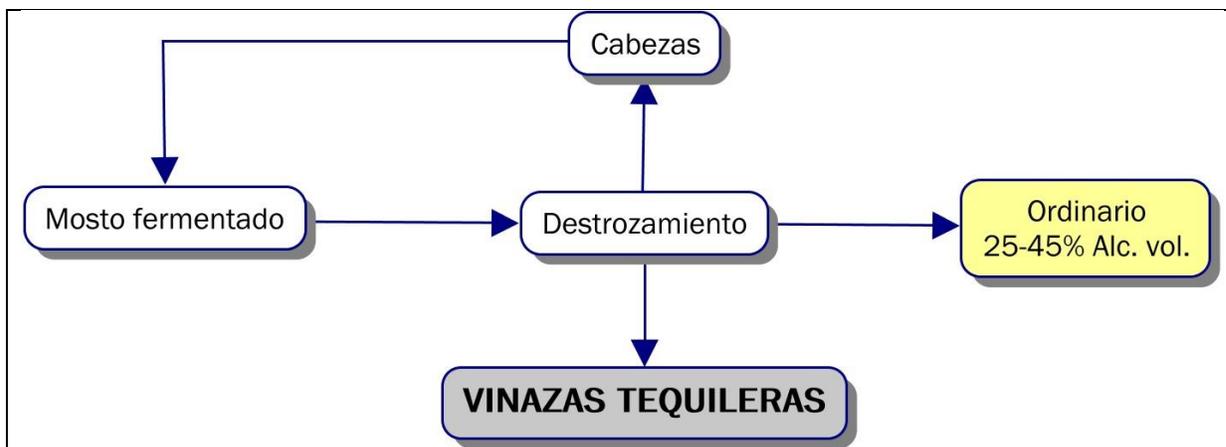


Figura 2. Destrozamiento y generación de vinazas

La composición de las vinazas en general varía según la materia prima utilizada para la producción del alcohol, ya sea caña de azúcar, remolacha, uva, piloncillo, o distintos tipos de agave. Para el caso específico de las vinazas tequileras, éstas se componen de pequeñas fibras de agave, fructuosa, glucosa, aldehídos y sustancias no volátiles que permanecen en el fondo de las columnas o alambiques de destilación (Ibarra *et al.*, 2010).

Las vinazas tequileras son de color café turbio y oscuro debido al elevado contenido de sólidos suspendidos (SS) que van de 20 a 50 g·L⁻¹; poseen un olor característico a alcohol-caramelo, similar al adquirido por el agave cocido; y se componen en promedio de 90% agua y 10% sólidos (CyD, 2017).

Las principales características fisicoquímicas de las vinazas son: alta carga orgánica medida como Demanda Química de Oxígeno (DQO) y Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), cuyos valores se encuentran en un rango de 50,000 a 150,000 y 35,000 a 60,000 mg·L⁻¹, respectivamente; alta concentración de sólidos suspendidos (SS) (20,000-50,000 mg·L⁻¹); un pH ácido (3-5 unidades); y alta temperatura de descarga que alcanza los 90°C (Estrada-Arriaga *et al.*, 2021; CyD, 2017; Ferral, 2015). Las características fisicoquímicas anteriormente mencionadas no cumplen con la NOM-001-SEMARNAT-1996 que establece los LMP de contaminantes en aguas que son descargadas a cuerpos receptores, y cuyos valores a cumplir son un rango de pH entre 6.5 a 8.5 unidades; temperatura menor a 40°C; y DBO, al igual que SST, menor a 200 mg·L⁻¹ (NOM-001-SEMARNAT-1996, 2012; PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017, 2018). Debido a la normatividad y a la cantidad de vinazas generadas anualmente, el tratamiento para este tipo de aguas residuales ha pasado a ser tema de debate en la comunidad científica, ya que se ha convertido en un serio problema de contaminación ambiental en el país.

Existen numerosos impactos ambientales provocados por la disposición indebida de vinazas tequileras, por ejemplo, al verter estas aguas residuales sin un previo tratamiento en el suelo se favorece el crecimiento de organismos patógenos en algunos cultivos, la presencia de grasas y aceites en este líquido promueve la formación de una película capaz de impermeabilizar los suelos e impedir la filtración del agua afectando directamente a los cultivos (CyD, 2017). Por otra parte, al ser descargadas en cuerpos de agua naturales provoca que las altas concentraciones de materia orgánica y sólidos suspendidos disminuyan la actividad fotosintética de organismos acuáticos debido a la escasa penetración de luz solar impidiendo la concentración de oxígeno disuelto, impactando finalmente en el deterioro de la vida acuática. Actualmente, la PROFEPA ha intentado aminorar el impacto provocado por la industria tequilera, obligando a los responsables a tomar medidas a fin de disminuir la contaminación (CRT, 2020). Sin embargo, la CONAGUA estimó que, hasta el año 2018, solo el 39% de las aguas residuales industriales reciben un tratamiento para cumplir con las normas ambientales de descarga.

Entre los tratamientos que generalmente se aplican a las vinazas el más común es el pretratamiento, el cual consiste en neutralizar el pH y disminuir la temperatura a 40°C. Para llevar a cabo este pretratamiento, la vinaza es almacenada en tanques que permiten su enfriamiento y, además, en el mismo tanque es adicionado hidróxido de calcio Ca(OH)_2 para neutralizar el pH. Sin embargo, el pretratamiento no es suficiente para llevar a cabo la remoción de los contaminantes, por lo que es necesario que las vinazas sean sometidas a un tratamiento posterior, ya sea fisicoquímico, biológico; o bien, una combinación de ambos (García, 2014) para poder cumplir con la normatividad vigente. En la actualidad, los tratamientos biológicos son los que se implementan mayormente a escala industrial.

2.4 Métodos fisicoquímicos

En el caso de los tratamientos fisicoquímicos, uno de los más utilizados son las lagunas de sedimentación con adición de polímeros, catalogadas como sistemas de tratamiento primario utilizadas como sistemas de almacenamiento y al mismo tiempo como sistema de remoción de sólidos. Sin embargo, al alcanzar el 80% de remoción de sólidos sedimentables, una de las desventajas es que la concentración de materia orgánica permanecerá mayor a 90%, además, si las lagunas no están técnicamente acondicionadas, existe el riesgo permanente de contaminación al suelo y subsuelo (García, 2014). Otro método fisicoquímico que también es considerado como tratamiento primario es el uso de Flotación con Aire Disuelto (DAF, por sus siglas en inglés), el cual consiste en la introducción de microburbujas de aire en un estanque con agua residual o lodo. Al ascender las burbujas, las partículas presentes en el agua se adhieren a éstas, separándose y formando una capa flotante de material concentrado. A pesar de que esta tecnología no es frecuentemente utilizada a escala industrial, se ha observado que con la adición de polímeros acelerara la separación de los sólidos suspendidos (SS), promoviendo una remoción del 80%; sin embargo, no se obtienen remociones significativas en cuanto a sólidos disueltos y DBO^5 . Los altos costos hacen que la implementación a escala industrial de esta tecnología sea muy poco factible (Ferral, 2015).

Uno de los sistemas mayormente empleados a nivel piloto e industrial es la coagulación-floculación. La coagulación consiste en la desestabilización de partículas coloidales que se encuentran en aguas residuales por acción de un compuesto químico, mejor conocido como coagulante. Una vez que este compuesto reacciona con los coloides, ocasiona la atracción de estos, generando coloides de un mayor tamaño (flóculo). Posteriormente se procede a la floculación, donde por medio de polímeros (floculantes) se forman coágulos tridimensionales y porosos que se unen para formar un coágulo de mayor tamaño y peso, permitiéndole sedimentar con facilidad (García, 2014). Esta tecnología remueve los sólidos solubles y sólidos coloidales de las vinazas en un 20 y 30%, respectivamente, a nivel laboratorio se ha demostrado que se puede remover aproximadamente un 70% de color y 37% de DQO. Otros estudios han demostrado (a escala piloto) remociones de DQO hasta de un 100% utilizando polímeros catiónicos (Ferral, 2015), sin embargo, su implementación a escala real eleva considerablemente los costos, debido los polímeros empleados.

Otro método que ha sido estudiado y que se aplica actualmente a escala industrial, es la evaporación de vinazas. Dicho método consiste en concentrar las vinazas calentándolas en evaporadores de efecto múltiple (evaporadores en serie). La vinaza concentrada puede ser empleada como biocombustible, incinerándolas en calderas para la producción de vapor para el proceso de evaporación de más vinazas; no obstante, dicho proceso no puede llevarse a cabo completamente utilizando las vinazas como único combustible, pues no poseen características naturales de combustible, lo que hace necesario el uso de combustibles fósiles u otro por el estilo, tendiendo finalmente esta tecnología beneficios ambientales muy bajos (Retes, 2014). Otro aprovechamiento es en la producción de composta como fertilizante líquido o como aditivo de alimento para animales. Esta tecnología reduce en volumen más del 50% de las vinazas, pero requiere de altos costos de inversión, además, diversos estudios reportan que las vinazas provocan impactos nocivos en el suelo (Retes, 2014).

En los últimos años han sido desarrollados diferentes métodos para el tratamiento de vinazas a escala laboratorio, tales como electrocoagulación y filtración con membranas. La primer tecnología consiste en la inducción de corriente eléctrica en el agua residual a través de placas metálicas paralelas de distintos materiales como hierro o aluminio, con el fin de desestabilizar las partículas de contaminantes que se encuentran suspendidas, emulsionadas o disueltas en el medio acuoso (García, 2014). La segunda tecnología se basa en la implementación de membranas de microfiltración, ultrafiltración y nanofiltración. Retes (2014) reportó remociones del 85% de color y 93% de DQO en vinazas vinícolas empleando electrocoagulación, mientras que da Silva *et al.*, (2020) y Lebron *et al.*, (2020) reportaron remociones de color del 98 y 99 % respectivamente, y DQO del 87 y 62% respectivamente, ambos empleando micro y nanofiltración para el tratamiento de vinazas de caña de azúcar.

Otras tecnologías que se han estudiado a nivel laboratorio son la integración de sistemas de coagulación-floculación, sistemas biológicos aerobios y sistemas de oxidación avanzada con ozono, el cual es un potente oxidante altamente soluble en agua, rápidamente disponible y no genera subproductos dañinos. La adición de radiación ultravioleta (UV) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) aumentan la eficiencia de esta tecnología, lo cual se debe a la generación de radicales

orgánicos como el hidroxilo (OH^-) el cual es capaz de oxidar compuestos orgánicos e inorgánicos (García, 2014). Esta tecnología tiene una eficiencia de remoción de SS de 100% y un 85% en la remoción de materia orgánica, además de también remover el color de las vinazas. No obstante, este tratamiento demanda elevados costos de operación e infraestructura que no es accesible para la mayoría de los productores que corresponden a pequeñas y medianas empresas (Ferral, 2015; Retes, 2014; Lira, 2013).

Si bien, la mayoría de los tratamientos fisicoquímicos que se describieron presentan altas eficiencias de remoción de contaminantes, también muestran dos grandes desventajas: sus costos elevados y el empleo de electrolitos que pueden provocar interferencias con la matriz y generar subproductos más dañinos para el ambiente, incrementando los costos de operación (García, 2014). Por ende, los industriales tequileros buscan métodos alternativos para el tratamiento de las vinazas.

2.5 Métodos biológicos

Los tratamientos biológicos se basan en la implementación de consorcios microbianos que a través de reacciones bioquímicas logran una oxidación o biodegradación de los compuestos contaminantes presentes en el agua residual (Sosa, 2013). Desde hace más de tres décadas se han empleado sistemas biológicos para el tratamiento de las vinazas tequileras, tales como sistemas anaerobios, aerobios y combinaciones en serie de ambos.

2.5.1 Digestión aerobia

El tratamiento biológico aerobio consiste en la degradación de materia orgánica presente en el agua residual por medio de microorganismos en presencia de oxígeno, lo que implica un largo periodo de aireación. En este proceso a medida que se agota el sustrato los microorganismos comienzan a consumir su propio protoplasma con el fin de obtener la energía necesaria para realizar sus reacciones de mantenimiento celular. La digestión aerobia reduce la cantidad de sólidos volátiles en el lodo, por lo que, a su vez, elimina olores desagradables y su potencial de putrefacción, facilitando su disposición. Los subproductos que se generan en este tratamiento son dióxido de carbono (CO_2), biomasa (lodo) y agua (CONAGUA, 2015). Para el tratamiento de vinazas tequileras, la digestión aerobia no es comúnmente empleada como único tratamiento, sino que, por lo general, es añadido a un tratamiento en serie después de la digestión anaerobia; ya que, a diferencia de este último, la microbiota que trabaja en presencia de oxígeno no soporta las altas cargas orgánicas de materia orgánica que poseen las vinazas.

2.5.2 Digestión anaerobia

La digestión anaerobia, también llamada biometanización, es un proceso biológico natural en el que bacterias anaeróbicas estrictas, en ausencia de oxígeno molecular (O_2), realizan una fermentación estable y autorregulada en la que la materia orgánica presente en las aguas residuales es asimilada, degradada y mineralizada a una mezcla de gases llamada “biogás”, el cual se compone principalmente de 35–75% CH_4 , 15–60% CO_2 y 5–10% vapor de agua (Gabriel y Sierra, 2017).

El tratamiento anaerobio es capaz de alcanzar eficiencias de degradación entre 70 y 95% de la materia orgánica contenida en las vinazas (Estrada-Arriaga *et al.*, 2021; Houbbron *et al.*, 2016; Ferral, 2015; Cabrera y Díaz, 2013), además, presenta otras ventajas significativas respecto al tratamiento aerobio, por ejemplo, existe un ahorro económico al no requerir de gran cantidad de energía para el mezclado mecánico; a diferencia de la digestión aerobia, que ocupa cantidades significantes de energía para realizar la aireación del proceso.

La mayoría de las aguas residuales industriales carecen de nutrientes para mantener un crecimiento biológico, sin embargo, el costo por la adición de nutrientes es significativamente más bajo para los procesos anaerobios en comparación a los aerobios, debido a que en el proceso anaerobio se produce un menor volumen de lodos (Sosa, 2013). De igual manera, esto también beneficia en la disminución de costos de operación ya que el tratamiento y disposición final de los lodos representa casi el 50% del costo total de los sistemas de tratamiento de aguas residuales (García, 2014). Por otro lado, los procesos anaerobios soportan cargas orgánicas altas ($3.2\text{--}32 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) en comparación con los procesos aerobios ($0.5\text{--}3.2 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), razón por la cual el volumen de instalación y el espacio pueden ser reducidos (Sosa, 2013). Otra ventaja que hace a la digestión anaerobia tan atractiva es la generación de energía mediante el aprovechamiento de la producción de biogás rico en metano. El uso de este bioproducto para la generación de energía en las plantas de digestión permite la conservación de más del 90% del contenido calórico de los sustratos orgánicos tratados (García, 2014).

La investigación sobre la implementación de esta tecnología ha avanzado considerablemente en las últimas tres décadas y gracias a estas ventajas se ha consolidado como una opción óptima para el manejo de efluentes industriales (Sosa, 2013), además de que, en la actualidad, está ampliamente probado para la degradación de la materia orgánica y recuperación de energía en forma de biogás (Red Española de Compostaje, 2012).

2.6 Fases de la digestión anaerobia

El proceso de digestión anaerobia se compone de cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis o fermentación, acetogénesis o β -oxidación y metanogénesis. Estas etapas se presentan en la Figura 3 y cada una de ellas se detalla a continuación.

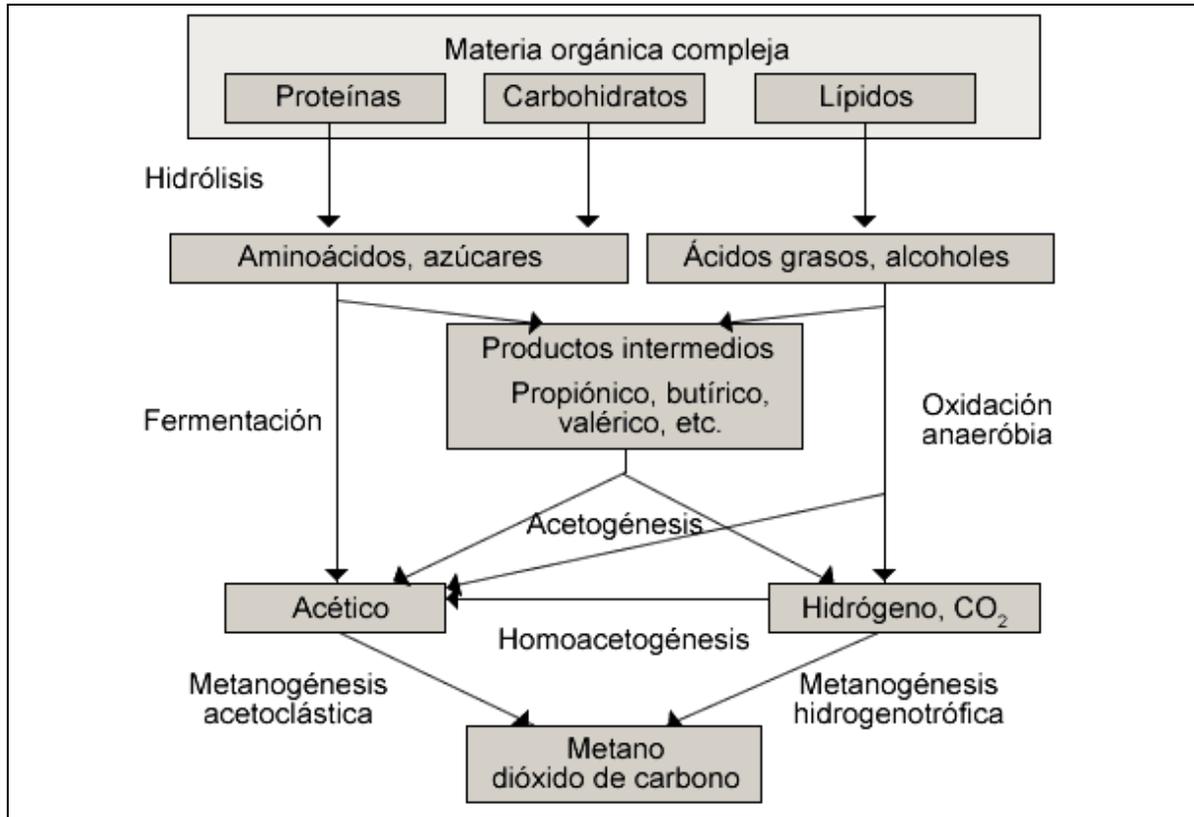


Figura 3. Proceso de digestión anaerobia (García, 2014)

2.6.1 Hidrólisis

La hidrólisis es la primera etapa del proceso de digestión anaerobia. Consiste en un proceso extracelular en el que los microorganismos excretan enzimas para catalizar la hidrólisis de polímeros complejos (proteínas, carbohidratos y lípidos) y convertirlos en moléculas más simples, haciendo posible su disolución en el medio acuoso que les rodea. Esas moléculas, debido a su tamaño y simplicidad estructural, son capaces de ser transportadas al interior de los microorganismos a través de la membrana celular. Las bacterias presentes en esta etapa pueden ser anaerobias obligadas o facultativas, como *Clostridium*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, las cuales son estables en un rango de pH de 5 a 11 unidades (CONAGUA, 2015). La importancia de esta etapa radica en que, además de suministrar sustrato asimilable para los grupos microbianos posteriores (bacterias acidogénicas, que no pueden absorber polímeros orgánicos complejos), reducen el oxígeno disuelto y gaseoso que pudiese estar presente en el sistema (Parra, 2014). La velocidad de esta etapa depende de la cantidad de materia orgánica, el área superficial, la concentración de biomasa, y, la producción y absorción de enzimas.

2.6.2 Acidogénesis

Durante esta etapa, también conocida como fermentación, las bacterias acidogénicas o fermentativas que, al igual que en la hidrólisis, pueden ser obligadas o facultativas (como *Bifidobacterium spp.* y *Selenomonas spp.*); utilizan los productos de la hidrólisis para formar

compuestos intermedios. Los productos de la fermentación constan de 51% acetato, 19% hidrógeno y el resto se compone de productos más reducidos como los AGV (ácidos grasos volátiles), entre los que se puede encontrar el ácido propiónico y el ácido butírico, alcoholes, lactatos y dióxido de carbono (CONAGUA, 2015). En esta etapa se produce el ácido orgánico más importante para la producción de metano, que es el ácido acético (acetato); así como el hidrógeno y el dióxido de carbono, que son el sustrato directo para las arqueas metanogénicas (Parra, 2014). La generación de subproductos en esta etapa depende de la presión parcial del hidrógeno; pues al incrementar ésta, se producen menos compuestos reducidos, tales como el acetato. La fermentación es comúnmente la etapa más rápida, sin embargo, puede ser inhibida si se presenta un pH menor a 4 unidades.

2.6.3 Acetogénesis

Durante la acetogénesis o β -oxidación, las bacterias acetogénicas se encargan de oxidar algunos compuestos que no pueden ser aprovechados directamente por las bacterias metanogénicas como los AGV, los ácidos grasos de cadena larga, ácidos grasos aromáticos y alcoholes. De esta manera, se producen nuevos compuestos como el acetato, hidrógeno y dióxido de carbono, que sí pueden ser asimilados y aprovechados en la metanogénesis. El acetato, al igual que en la acidogénesis, es el compuesto considerado más importante que se genera en esta etapa, ya que aproximadamente el 70% de las bacterias metanogénicas emplean acetato para la producción de metano. Al igual que en las etapas anteriores, en esta etapa participan bacterias anaerobias obligadas y facultativas como *Acetobacterium spp.*, *Sporomusa spp.* y *Ruminococcus spp.* Este grupo de microorganismos puede soportar cambios en los valores de pH y temperatura.

2.6.4 Metanogénesis

Finalmente, en la metanogénesis, los principales productos de la acidogénesis y acetogénesis (acetato, hidrógeno y dióxido de carbono) son transformados en metano y dióxido de carbono por acción de las arqueas metanogénicas, tales como *Methanococci spp.*, *Methanobacteria spp.* y *Methanomicrobia spp.* (García, 2014).

Aproximadamente el 70% del metano proviene del acetato, el cual sufre un proceso de descarboxilación ocasionado por las arqueas metanogénicas acetoclásticas y, el 30%, tiene origen en la reducción del dióxido de carbono por el hidrógeno a metano, el cual es empleado por las arqueas metanogénicas reductoras; a esta fase se le conoce como metanogénesis hidrogenotrófica (Parra, 2014). Las bacterias partícipes en esta etapa son estrictamente anaerobias, por lo que son altamente sensibles a la presencia de O_2 y a los cambios en los parámetros de operación. Los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia (obligados y facultativos) mantienen una relación de simbiosis, por ejemplo, es de suma importancia contar con una gran cantidad de bacterias facultativas, ya que pueden efectuar reacciones de oxidación a través de la vía oxidativa y así remover el O_2 del agua residual. Esto es la clave para asegurar un proceso de digestión sin problemas, pues las arqueas metanogénicas son anaerobias obligadas y, si el O_2 no es removido, el proceso de metanogénesis puede inhibirse (Sosa, 2013).

Sin embargo, desde hace aproximadamente cuatro décadas, se ha estudiado una variación de la digestión anaerobia en la que, a través de la adecuación de condiciones para la inhibición de la

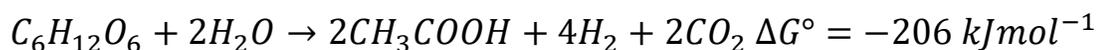
última etapa (metanogénesis), es posible la obtención de biogás rico en hidrógeno, el cuál presenta diversas ventajas por encima del metano; a esta tecnología se le conoce como fermentación oscura.

2.7 Fermentación oscura

La fermentación oscura es el proceso biológico más conveniente para la producción de hidrógeno (biohidrógeno), ya que permite obtener tasas de producción más altas en comparación con otros procesos biológicos, además de que no necesita luz solar, tiene un método de operación sencillo, existe una nula quema de hidrocarburos y se realiza una reducción de la descarga de nutrientes al ambiente (Albarrán, 2017).

La generación de biohidrógeno a través de la fermentación oscura se logra principalmente por bacterias estrictamente anaerobias o anaerobias facultativas, bajo condiciones anaerobias. En general, son especies del género *Clostridium* formadoras de esporas, facultativas como *Enterobacter sp* y *Bacilos sp*, algunas bacterias termofílicas, y acidogénicas anaerobias provenientes de lodos (Blanco, 2013).

La principal fuente de carbono de los microorganismos en la fermentación oscura son los monosacáridos, especialmente la glucosa, seguido de la xilosa, almidón, celulosa y otras fuentes que pueden ser generadas a partir de la hidrólisis de polisacáridos proteínas y lípidos; razón por la cual, la reacción de biotransformación de glucosa a hidrógeno, dióxido de carbono y ácido acético (Ecuación 1) es la ecuación más aceptada para la estimación de la producción teórica de hidrógeno en la fermentación oscura. Esta reacción indica que, por cada mol de glucosa consumido por los microorganismos, se producirán un máximo de 4 moles de hidrógeno, asumiendo que el único producto intermedio que se formará es el ácido acético, es decir, en condiciones ideales. El valor negativo de la energía libre de Gibbs indica que hay productos que se forman de manera espontánea, sin requerir energía (Blanco, 2013).



Ecuación 1. Reacción de biotransformación de glucosa en la fermentación (Blanco, 2013)

El hidrógeno obtenido se puede cuantificar en términos de tasa y rendimiento. La tasa de producción de hidrógeno (TPH) es la cantidad de hidrógeno (mL o L) producido por unidad de tiempo y por unidad de volumen del reactor (tasa volumétrica), o por unidad de biomasa (tasa específica); mientras que el rendimiento de hidrógeno (RH) es la cantidad de hidrógeno (mol, mL o L) producido por cantidad de sustrato consumido (mol o g de glucosa; DQO; o STV) (Blanco, 2013).

El RH depende de los productos intermedios o AGV que se forman durante la fermentación. El RH más alto (4 mol H₂·mol glucosa⁻¹) se alcanza cuando los únicos metabolitos formados son el ácido

acético, por lo tanto, cuando se forman otros metabolitos, el RH disminuye. Los RH obtenidos en los estudios reportados son menores al máximo teórico, debido a que la composición de los sustratos propicia la diversificación de las rutas metabólicas, dentro de las cuales se encuentran algunas que no generan, o que incluso consumen hidrógeno (Albarrán, 2017), como se puede apreciar en la Figura 4.

Ácido acético	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$
Acetona	$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow CH_3COCH_3 + 3CO_2 + 4H_2$
Ácido butírico	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$
Ácido propiónico	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$
Etanol	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$
Ácido Láctico	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH$

Figura 4. Reacciones generales de la fermentación oscura (Albarrán, 2017)

2.8 Factores importantes en la fermentación oscura

Ya que la fermentación oscura es parte de la digestión anaerobia, es importante mantener las condiciones que propicien la interrupción del proceso de digestión anaerobia justo en la etapa de acidogénesis para obtener una producción de hidrógeno. Existen diferentes factores y variables dependientes que deben ser controlados bajo condiciones óptimas para mantener una operación eficiente de los reactores, ya que un cambio brusco en algún parámetro podría desatar una reacción en cadena con efectos que pueden culminar en la inhibición total del proceso. La presencia de bacterias consumidoras de hidrógeno, tales como las metanogénicas, homoacetogénicas, y reductoras de sulfatos y nitratos, representan un factor que afecta y reduce la producción de hidrógeno (Blanco, 2013). Existen otros factores importantes en la fermentación oscura que se relacionan con las condiciones de operación, los cuales se describen a continuación.

2.8.1 Inóculo

Se han empleado cultivos puros y mixtos como inóculos para la producción de hidrógeno fermentativo. Para los cultivos puros en su mayoría corresponden a especies del género *Clostridium*, los cuales son bacilos gram-positivos, estrictamente anaerobios y formadores de esporas; y el género *Enterobacter*, que son *Bacilos* gram-negativos y anaerobios facultativos (Blanco, 2013). Los cultivos mixtos de bacterias anaerobias de lodos, composta y suelo resultan ser más prácticos que los puros, ya que los cultivos mixtos son más sencillos de manejar y controlar, y pueden tener una fuente más amplia de sustratos, ya sea complejos y no estériles; además de presentar mayor resistencia a los cambios en las condiciones ambientales. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que, en los cultivos mixtos, al ser consorcios microbianos, coexisten tanto bacterias productoras de hidrógeno como consumidoras, por lo cual, diversos

autores han empleado pretratamientos del inóculo con el objetivo de inactivar los microorganismos consumidores de hidrógeno y preservar la actividad de los productores (Albarrán, 2017). Dentro de los métodos para la inactivación de las bacterias consumidoras de hidrógeno utilizados se encuentran los siguientes:

- **Térmico:** El cultivo se somete a altas temperaturas por tiempos largos.
- **Choque ácido-alkalino:** Se crean condiciones de pH bajo y alto en periodos de tiempo cortos.
- **Aireación:** Suprime la actividad de las arqueas metanogénicas por el efecto tóxico del oxígeno sobre las bacterias anaerobias estrictas.
- **Radiación:** Luz ultravioleta, ultrasonido, infrarrojo o rayos gamma.
- **Adición de químicos:** Son compuestos inhibitorios de las arqueas metanogénicas como el BESA, cloroformo, acetileno, etc.
- **Presión:** Se crea una presión de selección continua dentro del reactor para controlar el crecimiento de las arqueas metanogénicas.

2.8.2 Sustrato

Los sustratos más utilizados son la glucosa, sacarosa y el almidón, debido a la fácil asimilación para los microorganismos por sus estructuras simples. No es ideal emplear sustratos con estructuras moleculares complejas, debido a que son difíciles de asimilar por los microorganismos, principalmente si se utilizan cultivos microbianos puros; sin embargo, existen pretratamientos aplicados a los sustratos complejos para hacerlos fácilmente asimilables para las bacterias productoras de hidrógeno, tales como la ultrasonificación, acidificación, congelamiento-descongelamiento, esterilización y las microondas (Blanco, 2013). Por el contrario, cuando se utilizan cultivos microbianos mixtos, el uso de estos pretratamientos no es necesario, ya que estos consorcios microbianos suelen presentar una mayor resistencia a las estructuras moleculares del sustrato, toxicidad, pH, contenido de materia orgánica, etc.

2.8.3 Temperatura

Los rangos en la operación están influenciados por las bacterias acidogénicas, las cuales son las encargadas de la producción de hidrógeno. El rango de temperatura al que estas bacterias son capaces de producir hidrógeno está entre 15 y 85°C, pudiendo operar a temperaturas psicrófilas (15–25°C), mesófilas (25–45°C), termófilas (45–65°C) e hipertermófilas (>65°C) (Blanco, 2013). La temperatura óptima del proceso que han reportado diversos autores se encuentra en los rangos mesofílico y termofílico, específicamente entre 30 y 50°C. No obstante, también existen estudios donde operan a temperatura ambiente, evitando gastos energéticos y obteniendo producciones de hidrógeno aceptables, alrededor de 11% menores a las obtenidas con temperaturas mesofílicas (Sotelo, 2017). A temperaturas mayores se favorece al incremento de la solubilidad de los compuestos orgánicos, aumentando su disponibilidad para los microorganismos. Asimismo, es posible incrementar las tasas químicas y biológicas de reacción, acelerando el proceso de conversión; por lo cual, el reactor puede ser de menor volumen y operar con tiempos cortos de retención hidráulica. Sin embargo, el incremento en la temperatura

también puede impactar negativamente, ya que al aumentar la temperatura se eleva la fracción de amoníaco (NH_3), compuesto que inhibe la actividad microbiana (Buitrón *et al.*, 2014).

2.8.4 Potencial de hidrógeno (pH)

Los efectos del pH se reflejan en la actividad enzimática de los microorganismos, pues cada enzima es activa en un intervalo específico de pH y posee una máxima actividad en su valor óptimo (Lorenzo y Obaya, 2005); por ende, cada grupo de microorganismos tiene valores o rangos óptimos de pH. Las bacterias productoras de hidrógeno exigen un pH entre 4 y 6.5 unidades, con un rango óptimo de 4.5-6 unidades. Si se presenta un pH debajo de 4 unidades, los AGV pueden provocar inhibición ácida; por otra parte, si el pH se encuentra por encima de 6.5 unidades, se pueden desarrollar las bacterias metanogénicas y tener una producción de metano mayor a la de hidrógeno (Espinoza *et al.*, 2009). La acidogénesis, que es en donde se produce el hidrógeno, da lugar al decremento del pH; por lo que, si el proceso global se encuentra equilibrado, el pH en el efluente (producto digerido) es menor que en el influente (producto bruto) (San Miguel y Gutiérrez, 2015).

2.8.5 Potencial de óxido-reducción (ORP)

Es conveniente mantener el potencial redox (ORP) en un rango de -130 a -300 mV para asegurar un ambiente reductor que las bacterias productoras de hidrógeno necesitan para su actividad (Vongvichiankul, Deebao, y Khongnakorn, 2017). Sin embargo, valores muy por encima de estos (incluso de 0 mV) pueden registrarse en los reactores sin suponer una baja en el rendimiento del proceso, pues las bacterias anaerobias se reproducen en ambientes reductores con $\text{ORP} \leq 0$ mV (San Miguel y Gutiérrez, 2015).

2.8.6 Producción de biogás

Es el parámetro más común para medir. Puede ser expresado en términos de tasa o de producción. La importancia de este parámetro radica en que permite una visualización del rendimiento global del proceso. Sin embargo, no puede ser empleado para detectar desestabilizaciones en etapa temprana, puesto que el cambio en la tasa de producción de biogás depende de las cargas orgánica e hidráulica y de la composición del sustrato, además, una disminución en la producción de biogás ocurre una vez que el proceso ya presenta un grado de inhibición significativa, o bien, una falla total (García, 2014).

2.9 Clasificación de los reactores anaerobios

Un proceso de tratamiento anaerobio puede llevarse a cabo en diferentes sistemas o reactores anaerobios. Los reactores anaerobios son unidades bien establecidas para la biodegradación de la materia orgánica del agua residual (Sosa, 2013).

La evolución de los sistemas anaerobios ha permitido controlar la biomasa activa en el reactor y desacoplar el tiempo de retención de sólidos (TRS) del tiempo de retención hidráulico (TRH), dado que la capacidad de tratamiento de los reactores biológicos está dada por la cantidad de biomasa activa que puede contener el sistema y por el contacto eficiente que se mantenga entre la

biomasa y el agua residual. Lo anterior ha llevado a que, con base en su evolución tecnológica, se cuente con tres generaciones de reactores (Tabla 1).

Tabla 1. *Diferentes tipos de reactores anaerobios (Fernández-Polanco y Seghezso, 2015)*

1^{ra} GENERACIÓN	2^{da} GENERACIÓN	3^{ra} GENERACIÓN
Fosa séptica	FAFA	Lecho fluidizado (LF)
Tanque Imhoff		
Laguna anaerobia	Reactor tubular de película fija	Lecho expandido
Digestor convencional		
Digestor completamente mezclado	Reactor anaerobio de lecho de lodos y flujo ascendente (RALLFA, RAFA o UASB)	
Contacto anaerobio		

2.9.1 Reactores de primera generación

Son aquellos en los cuales la biomasa se encuentra sedimentada con un mínimo de contacto con el sustrato, o bien, en suspensión sin la recirculación de sólidos; por lo que la relación TRS/TRH es igual a 1 (Moreno *et al.*, 2007).

2.8.2 Reactores de segunda generación

Se caracterizan porque los microorganismos son retenidos en el reactor, ya sea gracias a la presencia de un soporte al que se adhieren, o bien, por su capacidad de sedimentación. En estos sistemas el TRS es mayor que el TRH (TRS>TRH) (Moreno *et al.*, 2007).

2.8.3 Reactores de tercera generación

Contienen microorganismos en forma de biopelícula, adherida al soporte que se expande o fluidifica. Utilizan una corriente de recirculación para incrementar la velocidad ascendente y fluidificar el lecho de partículas de soporte; que puede ser arena, material plástico, cerámica, etc. El material de soporte proporciona una gran área superficial sobre la que se adhiere la biopelícula y mantiene una buena sedimentabilidad, asegurándose así la retención celular (Moreno *et al.*, 2007).

Por otro lado, los reactores anaerobios también pueden clasificarse de acuerdo con sus regímenes de operación: de tipo batch, semi-continuo y continuo; y se describen a continuación.

2.8.4 Reactores de régimen batch

Estos reactores, también conocidos como reactores de alimentación por lotes, consisten en tanques herméticos con una salida de gas (Figura 5a) conectada a un gasómetro flotante donde

se almacena el biogás producido. En estos sistemas se introduce el material a degradar (sustrato) y se desarrolla la fermentación hasta que el contenido de materia prima disminuye y cesa la producción de biogás. Es un reactor muy sencillo en cuanto a su operación, sin embargo, presenta algunos inconvenientes, ya que la cantidad de biogás producido no es constante y su composición es variable. De igual manera, los primeros productos del proceso no son aptos para su aprovechamiento, debido a que presentan un alto contenido de CO₂ y aire. Asimismo, pueden presentarse problemas mecánicos en la carga y descarga de la materia orgánica (García, 2014). Aunque este sistema presenta todas estas desventajas, no suelen tener relevancia, ya que este régimen de alimentación se emplea en la etapa de arranque y estabilización de un digestor anaerobio, donde el principal objetivo es lograr la aclimatación de los microorganismos al sustrato.

2.8.5 Reactores de régimen semi-continuo y continuo

Los reactores semi-continuos son alimentados con materia orgánica de manera intermitente, donde el volumen del sustrato que ingresa desplaza una cantidad equivalente del efluente, por lo que la producción de biogás es relativamente continua. Este tipo de alimentación suele ser eficiente cuando las materias primas consisten en un suministro regular de subproductos fácilmente digeribles. En aplicaciones prácticas, esta alimentación suele dosificarse de una a tres veces al día.

En cambio, en los digestores de régimen continuo, la alimentación al sistema es un proceso ininterrumpido. El influente es equivalente al efluente descargado, con producciones de biogás uniformes en el tiempo. Principalmente, estos reactores son empleados para el tratamiento de aguas residuales industriales. Desde el punto de vista biológico, los sistemas en régimen continuo pueden degradar mayor volumen de sustrato en comparación con los semi-continuos (García, 2014) (Figura 5b). Los diseños de ambos reactores pueden observarse en la Figura 5.

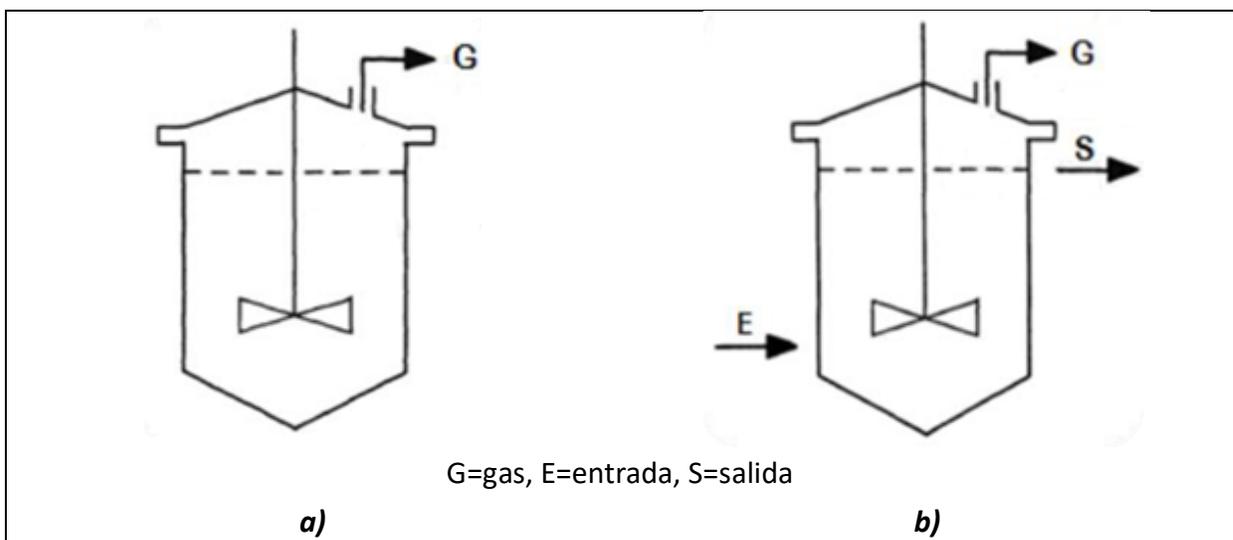


Figura 5. Reactores con régimen **a)** batch; **b)** semi-continuo y/o continuo.

2.10 Clasificación de la biomasa

En la Figura 6 se presentan los diferentes tipos de biomasa que existen en los sistemas anaerobios, los cuales se clasifican en tres tipos de agregación o de formación de la biomasa.

- Fijación microbiana a soportes fijos se presentan en reactores de biodiscos y en los filtros anaerobios de biopelícula fija de flujo ascendente o descendente.
- La adhesión microbiana sobre partículas en suspensión (flóculos), como en los procesos de los lechos expandidos y fluidificados (biomasa floculenta).
- La formación bacteriana sobre los granos o gránulos en ausencia de soporte, que se desarrolla en los RAFA (biomasa granular).

2.10.1 Biomasa floculenta

Es la biomasa o lodo que se presenta en forma de flóculo. Regularmente presenta bajos niveles de sedimentabilidad, que se clasifica como regular (0.5 y $2 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) (Torres *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2004). Los sistemas con este tipo de biomasa corren el riesgo de presentarse un lavado celular cuando se emplean altas tasas de carga orgánica, además, la biomasa generada es sensible a las fluctuaciones del medio como pH y temperatura (Albarrán, 2017).

2.10.2 Biomasa granular

Son la unión de diferentes microorganismos con forma definida por adhesión con sustancias poliméricas extracelulares. La estructura inicial sigue creciendo en una estructura compacta, siempre y cuando se mantengan condiciones favorables para mantenerla- Asimismo, si las fuerzas de corte o cizallamiento dentro del reactor no son favorables, se propicia su disgregación (Albarrán, 2017). La biomasa granular se caracteriza por su forma esférica, con un diámetro entre 0.5 y 5 mm . Presenta niveles altos de sedimentabilidad, calificado como excelente (40 a $60 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) (Moreno *et al.*, 2007). Este tipo de agregación de la biomasa ha sido ampliamente usado para la producción de hidrógeno en el tratamiento de aguas residuales en los RAFA, dentro de los cuales, los gránulos se mantienen suspendidos debido a la producción de biogás y al flujo del influente (Albarrán, 2017).

2.10.3 Biomasa fija (biopelícula)

También conocida como biomasa inmovilizada. Casi cualquier superficie inmersa en un líquido puede ser colonizada por células microbianas. Los organismos fijos a la superficie se reproducen y segregan sustancias poliméricas extracelulares que forman una matriz estructural sobre la célula y a su alrededor, la que eventualmente formará la biopelícula. De esta manera, las biopelículas están constituidas por bacterias fijas a un soporte y, frecuentemente, inmersas en una matriz polimérica orgánica de origen microbiano y sustancias orgánicas e inorgánicas unidas por dicha matriz (Moreno *et al.*, 2007). Los sistemas de biomasa fija pueden tratar sustratos con alta carga orgánica, ya que cuentan con una alta concentración de biomasa, obteniendo mayor estabilidad y resistencia a cambios en las condiciones ambientales como pH, temperatura, concentración de toxinas o inhibidores; además de permitir la recuperación y reutilización de la biomasa (Albarrán, 2017).

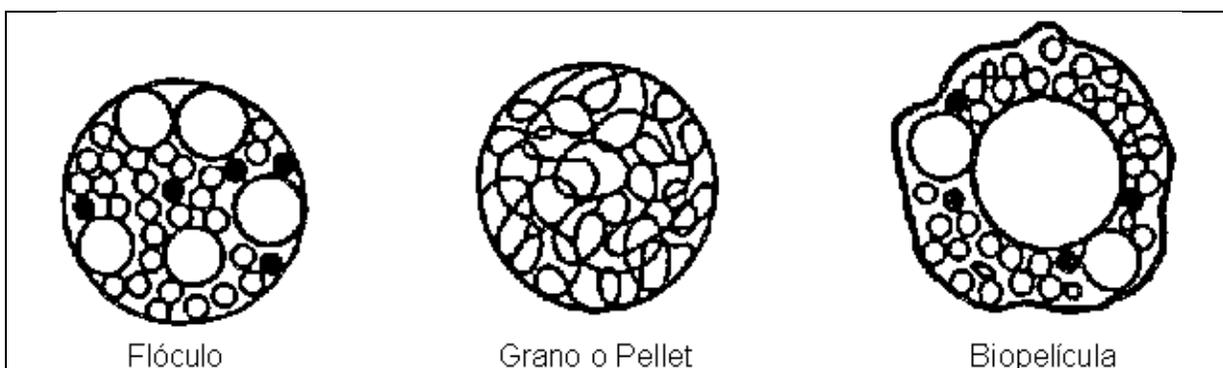


Figura 6. Formas de la biomasa anaerobia

En la Tabla 2 se mencionan diferentes tipos de reactores y la forma en que se presenta su biomasa (Fernández-Polanco y Seghezzi, 2015). Para esta investigación, se hará énfasis en la biomasa floculenta y granular.

Tabla 2. Formas de biomasa en los reactores anaerobios

SISTEMA DE RETENCIÓN DE LA BIOMASA	FORMA DE LA BIOMASA	TIPO DE REACTOR ANAEROBIO
Sedimentación	Flóculo	Proceso de contacto
Sedimentación	Grano (pellet)	RAFA
Adsorción en soporte inerte y no poroso	Biopelícula	FAFA Discos biológicos rotatorios Lecho expandido LF
Adsorción en soporte inerte poroso	Biopelícula	FAFA LF

2.11 Cinética de degradación de materia orgánica

En la digestión anaerobia, las bacterias se reproducen mediante el consumo de sustratos orgánicos e inorgánicos; a través de reacciones de óxido-reducción obtienen la energía potencial almacenada en los enlaces y ésta se distribuye en la célula, ya sea canalizándose por su crecimiento o reproducción. Partiendo de los conceptos básicos de los procesos biológicos de degradación anaerobia, es posible comprender el comportamiento microbiano y por tanto propiciar condiciones que favorezcan su reproducción a fin de optimizar su desempeño (Padilla, 2010).

Generalmente, el análisis cinético se realiza sobre el proceso global de fermentación, sin embargo, algunos estudios refieren únicamente a la etapa de solubilización y formación de AGV. La velocidad a la que la materia orgánica es transformada durante la digestión anaerobia depende de la concentración del sustrato, que funciona como donador de electrones y de la velocidad de consumo del sustrato por el catalizador, en este caso, la biomasa activa (Padilla, 2010).

Entre los modelos cinéticos empleados con mayor frecuencia en sistemas anaerobios se encuentran el modelo de primer orden, Grau-segundo orden y Stover-Kincannon. Los primeros dos modelos se aplican comúnmente a sistemas de biomasa suspendida, en especial a reactores de mezcla completa; mientras que el modelo de Stover-Kincannon se aplica principalmente a sistemas de biomasa fija (Padilla, 2010), como el de la presente investigación, por lo que a continuación, únicamente se describe este último modelo.

2.11.1 Modelo de Stover-Kincannon

En este modelo el consumo de sustrato se expresa como una función de la COV debido a la cinética monomolecular de los reactores de biopelícula, tales como los FAFA. Debido a la dificultad para medir el área superficial activa, la cual soporta el crecimiento de la biopelícula, este modelo emplea el volumen efectivo del reactor (Padilla, 2010). El modelo linealizado se expresa como se muestra en la Ecuación 2.

$$\frac{V}{Q \cdot (S_0 - S_e)} = \frac{K_B}{U_{max}} \frac{V}{Q \cdot S_0} + \frac{1}{U_{max}}$$

Ecuación 2. Modelo cinético linealizado de Stover-Kincannon (Kumar, Bhunia y Roshan, 2014)

Donde:

V = Volumen efectivo del reactor (L)

Q = Caudal ($L \cdot d^{-1}$)

S_0 = Concentración del sustrato en el influente ($g \cdot L^{-1}$)

S_e = Concentración del sustrato en el efluente ($g \cdot L^{-1}$)

U_{max} = Constante de la tasa máxima de consumo de sustrato ($g \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$)

K_B = Constante del valor de saturación ($g \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$)

Al graficar $\frac{V}{Q \cdot (S_0 - S_e)}$ (inverso de la tasa de remoción de la COV) vs $\frac{V}{Q \cdot S_0}$ (inverso de la tasa de la COV total), se produce una línea recta. La intersección y la pendiente de esa línea están dadas por $\frac{1}{U_{max}}$ y $\frac{K_B}{U_{max}}$, respectivamente (Faekah, Fatihah y Samba, 2020)

El modelo de Stover-Kincannon ha sido aplicado a FAFA mesofílicos y termofílicos en régimen continuo para el tratamiento de licores de pulpa de papel y aguas residuales de almidón simulado,

filtros anaerobios para el tratamiento de aguas residuales de soja, reactores anaerobios híbridos, etc. (Karapinar, 2004).

CAPÍTULO 3. ANTECEDENTES

Hace algunas décadas se ha observado que existe la posibilidad de emplear los procesos anaerobios para la producción de hidrógeno sin llegar a la transformación del sustrato a metano (López *et al.*, 2010). El principal interés en el uso del hidrógeno es que este combustible no contribuye a la generación de gases de efecto invernadero, ya que como subproducto de su combustión sólo se genera agua, además, tiene un alto poder calorífico ($122\text{-}142 \text{ KJ}\cdot\text{g}^{-1}$). Por ejemplo, el valor energético de 1 Kg de hidrógeno es equivalente al de 2.4 Kg de metano o 2.75 veces más energía que la que aportan los hidrocarburos. Si bien es cierto que la materia orgánica procedente de aguas residuales es probablemente insuficiente para sostener una economía global basada en el hidrógeno, esta forma de producción de energía renovable podría ayudar a compensar de forma sustancial los costos del tratamiento de las aguas residuales (sobre todo aquéllas con muy altas concentraciones de materia orgánica), así como contribuir al aprovechamiento del hidrógeno como fuente de energía (Buitrón y Carvajal, 2009).

En los procesos anaerobios tradicionales, el hidrógeno se produce a través de la hidrólisis de la materia orgánica; sin embargo, éste se utiliza inmediatamente por los microorganismos consumidores de hidrógeno, tales como los formadores de metano y las bacterias sulfato-reductoras. Por lo tanto, la cantidad de hidrógeno presente en la fase gas es pequeña. No obstante, en ausencia o debido a la inhibición de las bacterias consumidoras de hidrógeno, la cantidad de hidrógeno formada bajo condiciones apropiadas se puede incrementar significativamente. Por ejemplo, Espinoza *et al.*, (2009) estudiaron el efecto del pH, TRH y temperatura en un biorreactor semicontinuo (de 1 L de volumen total) para el tratamiento de vinazas tequileras por digestión anaerobia. La vinaza utilizada en el experimento tuvo una DQO de $64 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que el inóculo consistió en lodo digerido de un reactor mesofílico de una planta cervecera. Añadieron al reactor una mezcla de 90% vinaza y 10% inóculo, utilizando un volumen efectivo de 600 mL. De acuerdo con el estudio, en donde se realizó un diagrama de superficie mediante un análisis ANOVA, la producción de hidrógeno se vio optimizada bajo condiciones específicas de temperatura (55°C), pH ácido (5.5 unidades) y TRH largo (5 d); alcanzando una TPH máxima de $2.77 \text{ L H}_2\cdot\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$ y RH máximo de $216 \text{ mL H}_2\cdot\text{gDQO}^{-1}$.

Por su parte, Buitrón y Carvajal (2009) evaluaron la factibilidad de producir hidrógeno a partir de vinaza tequilera, empleando un biorreactor que operó como un ASBR (Anaerobic Sequencing Batch Reactor). El sistema consistió en un reactor de vidrio con volumen de 6 L, el cual operó a un pH de 5.5 unidades. Como inóculo utilizaron lodo procedente de un reactor anaerobio de una PTAR de la industria cervecera. Durante la experimentación evaluaron dos temperaturas (25 y 35°C) y dos TRH (6 y 12 h). Como resultado reportaron que la mayor TPH y RH obtenidos fueron de $1.39 \text{ L H}_2\cdot\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$ y $348 \text{ mL H}_2\cdot\text{gDQO}^{-1}$, respectivamente, al operar con una temperatura de 35°C , TRH de 6 h y concentración del sustrato de $5 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}$. Además, reportaron una remoción de DQO del 20% y contenido de hidrógeno en el biogás (CHB) entre 30 y 47%. Reportaron que la reducción del TRH a 6 h fue favorable para la producción de hidrógeno, inhibiendo el crecimiento de las bacterias metanogénicas (consumidoras de hidrógeno). Los resultados demostraron que a menor

TRH es mayor la TPH. Asimismo, concluyeron que a temperaturas mesofílicas (35°C) se obtiene una mayor velocidad específica de producción de hidrógeno (VEPH) que a temperatura ambiente (25°C).

Un año más tarde, nuevamente Buitrón y Carvajal (2010) estudiaron el efecto de parámetros como la temperatura (25 y 35°C), el TRH (12 y 24 h) y la concentración inicial del sustrato (0.25-5 gDQO·L⁻¹) en la producción de hidrógeno a partir de vinaza tequilera utilizando un ASBR. El lodo empleado como inóculo provino de un reactor UASB que trataba efluentes de la industria cervecera, y para la activación de las bacterias acidogénicas, el lodo fue pretratado térmicamente en un horno a 104°C por 24 h. Obtuvieron la máxima TPH de 1.21 L H₂·L⁻¹·d⁻¹, un RH máximo de 202 mL H₂·gDQO⁻¹, un CHB promedio y máximo del 29 y 40%, respectivamente, y una remoción de DQO del 16% cuando el reactor operó a 35°C, con TRH de 12 h y alimentación del sustrato 3 gDQO·L⁻¹. Aunque cuando el reactor fue alimentado con una concentración del sustrato de 1 gDQO·L⁻¹ y a la misma temperatura y TRH, obtuvieron el valor máximo de RH de 296 mL H₂·gDQO⁻¹. La formación de metano se observó cuando se aplicaron TRH largos.

Por otro lado, Blanco (2013) realizó una revisión crítica de estudios sobre la producción de hidrógeno vía fermentación oscura que fueron publicados de 1903 al 2012, esto para mostrar los factores más estudiados y los principales resultados en este tema para plantear retos y perspectivas en futuras investigaciones. Reportó que los reactores mayormente empleados son los tipo batch con inóculos provenientes de cultivos puros (*Clostridium* y *Enterobacter*) y algunos cultivos mixtos que provienen de lodos anaerobios de PTAR y compostaje. Los sustratos más empleados corresponden a glucosa, sacarosa y almidón; siendo pocos los que trabajaron con residuos orgánicos. Además, mencionó los rangos óptimos de operación de parámetros como el pH de 4.5-6 unidades, la temperatura de 26-37°C y el TRH 6-8 h. Por último, la máxima TPH reportada fue de 31.68 L H₂·L⁻¹·d⁻¹, utilizando glucosa como sustrato. Con base en el estudio, se encontró no solo la necesidad de optimizar factores que influyeran en la producción, sino también la necesidad de incrementar los estudios para su implementación.

Por su parte, González-Ugalde y Durán-Herrera (2013) evaluaron la producción de hidrógeno mediante la fermentación anaerobia de vinaza de melaza de caña de azúcar. Utilizaron un reactor UASB de 3 L. Para la inoculación del reactor, emplearon lodo proveniente de un reactor UASB industrial de la PTAR de una empresa de alimentos, el cual fue sometido a un pretratamiento térmico en baño María a 100°C durante 30 minutos para la inhibición de bacterias metanogénicas. Los gránulos productores de hidrógeno fueron formados en un reactor CSTR y posteriormente fueron transferidos al reactor UASB para iniciar su operación, en donde se mantuvo un pH de 5.5 unidades, una temperatura de 37°C, una concentración del sustrato de 20 gDQO·L⁻¹, y fueron probados dos TRH (6 y 12 h). Los mejores resultados se obtuvieron al operar a un TRH de 6 h, donde obtuvieron la máxima TPH de 0.32 L H₂·L⁻¹·d⁻¹, la remoción de DQO promedio de 20%, el máximo CHB de 13% y el máximo RH de 8 mL H₂·gDQO⁻¹. Tanto la producción de hidrógeno como la remoción de DQO presentaron una dependencia inversamente proporcional al TRH.

Arreola-Vargas *et al.*, (2013) evaluaron la factibilidad de la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados ácidos y enzimáticos de avena y paja, en un ASBR a 35°C y concentración del sustrato

de 5 gDQO·L⁻¹. En un primer experimento, la producción de hidrógeno fue reemplazada por la producción de metano. Presiones selectivas aplicadas en un segundo experimento previnieron exitosamente la producción de metano. Durante este experimento, se promovió la granulación de la biomasa alimentando con glucosa/xilosa como sustratos modelo. El RH máximo (313 mL H₂·g glucosa consumida⁻¹) y la TPH máxima (6.67 L H₂·L⁻¹d⁻¹) los obtuvieron con estos sustratos modelo. Una sustitución gradual de glucosa/xilosa por hidrolizado ácido propició la disgregación de los gránulos y disminución del RH y TPH. Cuando los sustratos modelo fueron sustituidos totalmente por el hidrolizado enzimático, el RH y TPH fueron 127 mL H₂·g glucosa consumida⁻¹ y 0.71 L H₂·L⁻¹d⁻¹, respectivamente. El análisis molecular reveló una pequeña diversidad bacteriana en las etapas con alta producción de hidrógeno y viceversa. Además, identificaron a *Clostridium pasteurianum* como las especies más abundantes en las etapas con mayor producción de hidrógeno. A pesar de que demostraron la factibilidad de la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados, obtuvieron menor rendimiento de éstos que de los sustratos modelo.

Posteriormente, Bittencourt *et al.*, (2014) evaluaron el potencial de la vinaza de caña de azúcar como sustrato para la producción de hidrógeno y AGV mediante un consorcio microbiano anaerobio. Propusieron dos diferentes medios: de una muestra de excremento de murciélago de fruta (LPBAH1) y de un lago de una granja lechera (LPBAH2). Utilizaron diferentes medios anaerobios con vinaza y diferentes fuentes de carbono: (1) sacarosa + vinaza (blanco), (2) melaza de caña de azúcar + vinaza y (3) jugo de caña de azúcar + vinaza. Los experimentos se llevaron a cabo en un biorreactor de 1.5 L de volumen efectivo sin agitación, a 37°C y TRH de 5 d. Seleccionaron el consorcio LPBAH1 suplementado con jugo de caña de azúcar (11.4 g carbohidratos·L⁻¹) como el mejor, ya que obtuvieron los valores máximos de RH, TPH y CHB de 179 mL H₂·gDQO⁻¹, 2.4 L H₂·L⁻¹d⁻¹ y 30%, respectivamente. Mientras que con el consorcio LPBAH2 suplementado con melaza (13 g carbohidratos·L⁻¹) obtuvieron valores máximos de RH, TPH y CHB de 167 mL H₂·gDQO⁻¹, 0.43 L H₂·L⁻¹d⁻¹ y 33%, respectivamente.

Por otro lado, Zampol *et al.*, (2014) evaluaron la producción de hidrógeno de un consorcio microbiano usando diferentes concentraciones de vinaza de caña de azúcar (2-13 gDQO·L⁻¹), a pH 5.5 unidades y temperaturas de 37 y 55°C. Los experimentos fueron realizados por triplicado en botellas de vidrio de 2 L de volumen efectivo y 1.2 L de volumen de trabajo, rellenando el volumen restante con 0.8 L de nitrógeno (N₂). El inóculo empleado, proveniente de un reactor UASB de una PTAR de un matadero avícola, fue tratado térmicamente en baño María a 90°C por 10 minutos para seleccionar los microorganismos más capaces para producir hidrógeno y para inhibir el crecimiento de microorganismos metanogénicos consumidores de hidrógeno. En sus resultados reportaron que, operando a una temperatura de 37°C, el incremento en la concentración del sustrato (2-13 gDQO·L⁻¹) no impactó significativamente el RH, presentando un valor máximo de 63 mL H₂·gDQO⁻¹ con una concentración de sustrato de 7 gDQO·L⁻¹; sin embargo, tuvo un efecto positivo en la producción potencial de hidrógeno (P) y en la TPH, con valores máximos de 943 mL H₂ y 0.25 L H₂·L⁻¹d⁻¹, respectivamente. Por otro lado, operando a 55°C, el incremento en la concentración del sustrato provocó una caída del RH, reportando valores de 66 a 13 mL H₂·gDQO⁻¹.

En el mismo año, Santos *et al.*, (2014) operaron dos reactores anaerobios de LF bajo temperatura termofílica (55°C) por 150 días para investigar el efecto de vinaza de caña de azúcar diluida y cruda en la producción de hidrógeno vía fermentación oscura usando un cultivo bacteriano mixto (LGA, Lodo Granular Anaerobio proveniente de un UASB generador de metano a partir de vinaza de caña de azúcar) como inóculo, al cual le aplicaron un pretratamiento térmico a 90°C por 10 min. Utilizaron un medio de soporte para la biomasa de arcilla expandida. Aunque observaron una producción de hidrógeno efectiva (CHB= 53%; TPH= 19.2 L H₂·L⁻¹·d⁻¹; RH= 22 mL H₂·gDQOañadido⁻¹) utilizando vinaza cruda (30 gDQO·L⁻¹), las condiciones operacionales óptimas fueron encontradas con 10 gDQO·L⁻¹, alimentado con vinaza diluida (TRH 6 H; COV 40 gDQO·L⁻¹·d⁻¹), alcanzando un RH de 81 mL H₂·gDQOañadido⁻¹, TPH de 10.32 L H₂·L⁻¹·d⁻¹, CHB de 52% y remoción de DQO del 8.5%. La producción de hidrógeno fue inhibida por la alta concentración de ácido butírico (3.7 g·L⁻¹) y acético (3 g·L⁻¹) en la vinaza cruda. El análisis de electroforesis reveló cambios en la población bacteriana de la biopelícula de arcilla expandida como función de la concentración del sustrato.

Unos meses más tarde, Buitrón *et al.*, (2014) estudiaron la factibilidad de producir hidrógeno a partir de vinaza tequilera en un FAFA. Para la experimentación emplearon un reactor con volumen efectivo de 1.7 L, el cual fue empacado (0.8 L) con anillos de poliuretano de 963 m²·m⁻³ de área de contacto. El reactor operó a un pH de 4.7 unidades y temperatura de 35°C. Se inoculó con LGA proveniente de un reactor UASB de la industria cervecera, el cuál fue pretratado térmicamente en un horno a 104°C por 24 horas para inhibir las bacterias consumidoras de hidrógeno. La primera etapa de operación consistió en 7 ciclos de 24 h de TRH, en régimen batch, alimentándose con 2.4 g glucosa·L⁻¹. En la segunda etapa operaron en régimen continuo, con un TRH de 4 h y 8 g glucosa·L⁻¹ (COV= 51.6 gDQO·L⁻¹·d⁻¹). Para la última etapa, operando con el mismo TRH (4 h), se probaron diferentes diluciones de glucosa-vinaza (100, 80, 40 y 0% glucosa; y 0, 20, 60 y 100% vinaza), siendo 8.5 g·L⁻¹ la DQO correspondiente al 100% en todos los casos. La máxima TPH y RH reportada utilizando vinaza cruda fue de 1.73 L H₂·L⁻¹·d⁻¹ y 194 mL H₂·gDQO⁻¹ respectivamente, con 64% de CHB y una remoción de DQO del 20%. Concluyeron que como la concentración de glucosa en la vinaza era de 1.2 g·L⁻¹, hubo una relación inversamente proporcional entre la dilución de vinaza-glucosa con la TPH y el CHB.

En el 2015, Marques *et al.*, evaluaron la producción de hidrógeno y metano a partir de vinaza de caña de azúcar en un reactor de LF de 1.45 de volumen total y arcilla expandida como material de soporte. El inóculo utilizado fue tomado de un reactor UASB de una PTAR porcícola, el cual es conocido por contener bacterias productoras de hidrógeno. Al inóculo se le dio un pretratamiento térmico en baño María a 90°C por 15 minutos para activar las bacterias acidogénicas. Se probaron dos concentraciones (5 y 10 gDQO·L⁻¹) y tres TRH (4, 2 y 1 h). Cuando el reactor operó con un TRH de 1 h y DQO de 5 g·L⁻¹, los valores máximos de TPH, RH y CHB que ellos reportaron fueron 13.68 L H₂·L⁻¹·d⁻¹, 517 mL H₂·gDQO⁻¹ y 34%, respectivamente.

Unos meses más tarde, Nunes *et al.*, (2015) evaluaron cuatro tipos de material de soporte: arcilla expandida (EC), carbón (Ch), cerámica porosa (PC) y polietileno de baja densidad (LDP); en cuatro FAFA de 2.3 L para la producción de hidrógeno a partir de vinaza de caña de azúcar. Los reactores fueron inoculados con lodo del proceso natural de fermentación de aguas residuales y

posteriormente operaron en paralelo, en régimen continuo, con un TRH de 24 h, COV de $36.2 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, temperatura de 25°C y pH entre 5.4 y 5.7 unidades. Los valores máximos de TPH de 509.5, 404, 81.4 y $10.3 \text{ mL H}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; RH de 51, 40, 8 y $1 \text{ mL H}_2\cdot\text{gDQO}^{-1}$; CHB de 37, 25, 21 y 3%; y remoción de DQO de 50, 46, 45 y 44% fueron observados en los reactores empacados con LDP, EC, Ch y PC, respectivamente. El estudio indicó que LDP fue el material más apropiado para la producción de hidrógeno, atribuyéndolo principalmente a que fue el medio de soporte con mayor área superficial específica ($9.4 \text{ cm}^2\cdot\text{g}^{-1}$) en comparación al resto de los materiales, superándolos por más del 10%.

Albarrán (2017), trabajando con vinazas vitivinícolas, propuso que, para mantener una producción continua de hidrógeno, es necesario recircular el biogás producido dentro del reactor para aumentar su velocidad de transferencia a la fase gaseosa y así evitar reacciones colaterales que comprometieran la estabilidad del sistema. El sistema consistió en un reactor UASB de 1.5 L de volumen total y 1.4 L de volumen efectivo. El inóculo utilizado consistió en LGA proveniente de un reactor UASB de la industria cervecera, el cual fue sometido a un pretratamiento térmico a 104°C por 24 h. Las condiciones de operación durante las pruebas experimentales fueron pH de 5.3 unidades, temperatura de 37°C , TRH de 5.5 h, DQO de $50 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}$ y COV de $218 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. La recirculación del biogás producido dentro del reactor granular mostró ser una opción adecuada para mejorar la producción de hidrógeno por fermentación oscura, ya que al emplear una velocidad superficial del biogás de $17.8 \text{ m}\cdot\text{d}^{-1}$ se propició la máxima TPH ($1.06 \text{ L H}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), el máximo RH ($47 \text{ mL H}_2\cdot\text{gDQO}^{-1}$) y el máximo CHB (48%), los cuales fueron 2.14 veces mayor a lo obtenido sin recirculación de biogás; este incremento es atribuible a la mejora en la velocidad de transferencia del hidrógeno de la fase líquida a la gaseosa. Este trabajo de investigación demostró que es posible producir hidrógeno vía fermentación oscura empleando como sustrato vinazas vitivinícolas, sin embargo, debe verse como una etapa de un tren de tratamiento y no como un único tratamiento.

En el mismo año, García-Depraect *et al.*, (2017) propusieron un proceso de co-digestión de vinaza y nejayote (aguas residuales de maíz procesado) para la producción de hidrógeno. Para esto, evaluaron diferentes relaciones de vinaza/nejayote (100/0, 80/20, 60/40, 40/60, 20/80 y 0/100 peso/peso) en un reactor por lotes a temperatura de 35°C y pH de 5.5 unidades. Los resultados mostraron que los valores máximos de TPH y RH fueron obtenidos con la relación 80/20, presentando valores de $2.57 \text{ NL H}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ y $115 \text{ NmL H}_2\cdot\text{gSTV}_{\text{adicionados}}^{-1}$, respectivamente. La mezcla de vinaza y el nejayote fueron complementarios en las concentraciones de nitrógeno, hierro, fósforo, magnesio y alcalinidad. Los cambios en la comunidad microbiana fueron analizados vía secuenciación Illumina MiSeq, donde se observó que *Acetobacter orientalis* predominó en el inóculo con presencia del 42.94%. Sin embargo, en la fase exponencial ésta fue remplazada por *Lactobacillus casei*, *Clostridium beijerinckii*, *Acetobacter lovaniensis* y *Sporolactobacillus terrae* con abundancias de 22.03%, 20.27%, 13.39% y 12.96%, respectivamente. Se estableció una simbiosis entre las bacterias de ácido láctico y acético, y las productoras de hidrógeno.

Por otra parte, Shan-Fei *et al.*, (2017) evaluaron la producción de hidrógeno mesofílico y metano a partir de vinaza mediante la digestión anaerobia en dos etapas. El inóculo que utilizaron fue LGA

proveniente de una industria cervecera, el cual fue sometido a pretratamiento térmico (30 minutos en baño María). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en botellas de 250 mL. Durante la etapa de producción de hidrógeno de la fermentación en dos etapas vertieron en cada botella una mezcla de 12.5 g de vinaza, 30 mL de inóculo pretratado y agua desionizada para completar un volumen efectivo de 150 mL. Utilizaron otras tres botellas como testigos, en las que únicamente añadieron el inóculo y agua desionizada. Durante la etapa de producción de metano las botellas después de la etapa de producción de hidrógeno fueron reinoculadas con 50 mL de LGA fresco. Para la fermentación en una etapa mezclaron en cada botella 12.5 g de vinaza, 50 mL de inóculo y agua desionizada para completar un volumen efectivo de 200 mL. Colocaron las botellas en un baño de agua con agitación 37°C con 120 rpm. Durante la digestión anaerobia en dos etapas, el RH y rendimiento de metano fue 14.8 mL H₂·gSTV⁻¹ y 274 mL CH₄·gSTV⁻¹. El rendimiento de metano de la digestión anaerobia en dos etapas fue 10.8% mayor que la de una etapa. Durante el proceso de producción de metano, la fase lag de la digestión anaerobia en dos etapas fue 9.1 días menor que la de una etapa. Asimismo, la eficiencia de remoción de STV y la recuperación de energía de la digestión anaerobia en dos etapas fue 10.4 y 12.9% respectivamente mayor que en la de una etapa.

En el 2018, Albanez *et al.*, estudiaron la factibilidad de producir hidrógeno mediante la co-digestión de vinaza/melaza de caña de azúcar en un AnSBBR (reactor anaerobio de biopelícula por lotes secuenciados, por sus siglas en inglés) de 6 L de volumen total y 5.6 L de volumen efectivo, operando a 30°C y con agitación mecánica de 200 rpm. Emplearon como inóculo lodo proveniente de un reactor anaerobio de un matadero de aves de corral. A dicho inóculo se le dio un tratamiento térmico que consistió en calentar 50 mL de lodo a 90°C por 15 minutos, seguido de su enfriamiento en un baño de hielo a 25°C. El medio de soporte para la biomasa que utilizaron fue pellets de LDPE (poliuretano de baja densidad), obtenidos del reciclaje de residuos plásticos. El reactor se empacó con 2.1 L de la mezcla de biomasa-medio de soporte y 3.5 L de sustrato, para el cuál probaron diferentes relaciones de vinaza/sacarosa y vinaza/melaza. Evaluaron DQO en el influente de 3 y 4 g·L⁻¹, y TRH de 3 y 4 h. La relación de vinaza/melaza con la que obtuvieron los mejores resultados fue 33% vinaza y 67% melaza, con un TRH de 3 h, DQO en el influente de 3 g·L⁻¹ y COV de 7.3 gDQO·L⁻¹·d⁻¹. Bajo estas condiciones, la TPH obtenida fue 0.11 L H₂·L⁻¹·d⁻¹, el RH de 70 mL H₂·gDQO⁻¹, con CHB de 16%, metano del 14%, y remoción de DQO de 19%.

Impulsados por las altas temperaturas de descarga de las vinazas (90-100 °C), Niz *et al.*, (2019) evaluaron el efecto de condiciones termofílicas extremas (70 °C) en la fermentación oscura de vinaza de caña de azúcar en un Reactor Anaerobio de Lecho Estructurado (ASTBR, por sus siglas en inglés). Evaluaron cuatro diferentes TRH (19, 15, 12 y 8 h). Largos TRH (19 h) resultaron en altas TPH (0.63 L H₂·L⁻¹·d⁻¹), altos RH (57 mL H₂·gDQO⁻¹) y alta estabilidad; con una COV de 56 gDQO·L⁻¹·d⁻¹. Descubrieron que la temperatura extrema inhibe la producción de polímero extracelular de los microorganismos, conduciendo a un crecimiento disperso y previniendo el exceso de acumulación de biomasa. Los altos valores del índice de vacío en los ASTBR, también son responsables de la baja retención de biomasa/sólidos. La vía principal para la producción de hidrógeno fue mediante la ruta del ácido láctico/acético, la cual depende mayormente del pH del medio fermentativo. Los géneros principales involucrados en la producción de hidrógeno a 70 °C fueron *Clostridium*, *Pectinatus*, *Megasphaera* y *Lactobacillus*.

Un poco más tarde, García-Becerra *et al.*, (2019) compararon la producción de hidrógeno mediante fermentación, usando vinaza tequilera cruda y desintoxicada. Ellos desintoxicaron la vinaza con carbón activado granular, el cual absorbió los componentes que pueden inhibir la producción de hidrógeno en la fermentación oscura, como los compuestos celulósicos, lignina, fenoles o melanoidinas. En los cultivos en batch, la desintoxicación de la vinaza produjo velocidades máximas de producción de hidrógeno 20% mayores, una reducción de 5.4 h en la fase lag y un RH 11% mayor, comparado con los resultados obtenidos con vinaza cruda. Las pérdidas de azúcares después de la desintoxicación provocaron que el RH fuera 30-40% menor con 5 y 15 gDQO·L⁻¹, comparado con los valores obtenidos con vinaza cruda. Con 30 gDQO·L⁻¹ no observaron diferencias significativas en la fermentación en batch. Para el cultivo en continuo con vinaza cruda obtuvieron TPH de 1.32-1.39 NL H₂·L⁻¹·d⁻¹ cuando añadieron nutrientes extra, mientras que con vinaza desintoxicada no pudo mantenerse una producción estable a pesar de la adición de nutrientes. También evaluaron la producción de hidrógeno a partir de vinaza diluida con agua sin nutrientes extra, en donde obtuvieron TPH cercanas a 0.42 NL H₂·L⁻¹·d⁻¹ y CHB cercano a 37%. De acuerdo a los autores, la acumulación de ácido láctico y una producción predominante de ácido butírico sobre ácido acético, pudieron ser las causas de que la dinámica de fermentación con vinaza sin nutrientes extra fuera especialmente susceptible a las altas concentraciones del sustrato y se prolongaran los TRH.

Por último, en una serie de estudios liderados por García-Depraect, realizados de 2018 a 2020, (García-Depraect y León-Becerril, 2018; García-Depraect *et al.*, 2019; García-Depraect *et al.*, 2020a; García-Depraect *et al.*, 2020b) evaluaron un novedoso proceso de tres etapas para la producción de lactato, hidrógeno y metano a partir de vinaza tequilera, enfocado en alcanzar una alta y estable TPH, utilizando lactato como precursor de hidrógeno. En la primera etapa (ruta de lactato-acetato), las condiciones de operación adaptadas y aplicadas a un ASBR fueron efectivas para mantener una concentración de lactato de 12.4 g·L⁻¹, correspondiendo al 89% del total de los ácidos orgánicos producidos. En la segunda fase, la estimulación de la fermentación oscura centrada en lactato, que implica el desacoplamiento de la producción de hidrógeno a partir de carbohidratos, fue un enfoque eficaz que permitió la producción estable de hidrógeno, teniendo fluctuaciones de TPH menores al 10%, con un valor máximo de 12.3 L H₂·L⁻¹·d⁻¹, RH de 541 mL H₂·gDQO⁻¹, CHB de 91% y remoción de DQO de 17%. Estos fueron los valores máximos que obtuvieron al final de su investigación, operando con TRH de 6 h y una COV de 169 gDQO·L⁻¹·d⁻¹. Finalmente, obtuvieron 1.6 L CH₄·L⁻¹·d⁻¹ y 6.5 L CH₄·L vinaza⁻¹ cuando alimentaron el efluente de la fermentación de hidrógeno a una tercera etapa metanogénica, permitiendo una mayor recuperación energética global (267.5 kJ·L vinaza⁻¹), aunque la última etapa requirió de una mayor optimización para aumentar la remoción de materia orgánica y la eficiencia de recuperación energética.

En la Tabla 3 se presenta un resumen de los antecedentes investigados, donde se muestran los datos más relevantes para el presente estudio.

Tabla 3. Resumen de antecedentes.

AUTOR	REACTOR	VINAZA	DQO (g·L ⁻¹)	TRH (h)	COV	TPH	RH	CHB (%)	REM DQO (%)
Espinoza- Escalante <i>et al.</i> , (2009)	Semi- continuo	Tequila	64	120	13	2.77	216	-	-
Buitrón y Carvajal (2009)	Lotes secuenc.	Tequila	5	6	20	1.39	348	47	20
Buitrón y Carvajal (2010)	Lotes secuenc.	Tequila	3	12	6	1.21	202	29	16
González- Ugalde y Durán -Herrera (2013)	RAFA	Caña de azúcar	20	6	80	0.32	8	13	20
Zampol <i>et al.</i> , (2014)	Lotes	Caña de azúcar	7	42	4	0.25	63	-	-
Buitrón <i>et al.</i> , (2014)	FAFA	Tequila	8.5	4	51	1.73	194	64	20
Bittencourt <i>et al.</i> , (2014)	Lotes	Caña de azúcar	30	24	30	2.4	179	30	-
Marques <i>et al.</i> , (2015)	Lecho fluid.	Caña de azúcar	5	1	120	13.7	517	34	-
Nunes <i>et al.</i> , (2015)	FAFA	Caña de azúcar	36	24	36	0.51	51	11	37
Albarrán (2017)	RAFA	Vino	50	5.5	218	1.22	47	46	12
Albanez <i>et al.</i> , (2018)	Filtro lotes secuenc.	Vinaza/ melaza (Caña de azúcar)	3	3	7	0.11	70	16	19
Niz <i>et al.</i> , (2019)	Lecho estruct.	Caña de azúcar	44	19	56	0.63	57	32	-
García- Depraect <i>et al.</i> , (2018-2020)	Agitación continua	Tequila	42	6	169	12.3	541	91	17

* COV (gDQO·L⁻¹·d⁻¹); TPH (L H₂·L⁻¹·d⁻¹); RH (mL H₂·gDQO_{removida}⁻¹)

CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA

La investigación se dividió en cinco etapas principales: (1) caracterización de la vinaza tequilera, (2) instalación del sistema experimental e inoculación de los filtros, (3) estabilización de los sistemas (en régimen batch), (4) pruebas experimentales (en régimen continuo) y (5) cálculo de parámetros de respuesta y análisis estadístico. A continuación se describe la metodología de cada etapa.

4.1 Etapa 1: Caracterización de la vinaza y la biomasa de estudio

La vinaza empleada como sustrato en la presente investigación provino de una industria tequilera ubicada en el municipio de Atotonilco, Jalisco, México. Para la determinación de las características fisicoquímicas presentes en dicha vinaza se analizaron los parámetros presentados en la Tabla 4, los cuales fueron determinados a lo largo de la experimentación.

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos evaluados en la caracterización de la vinaza tequilera.

PARÁMETRO	TÉCNICA
pH	APHA, 2012
ORP	
DQO	
DBO ₅	
ST y SS	
Nitrógeno amoniacal	HACH - Método Nessler (8038)
Sulfatos	HACH - Método SulfaVer 4 (8051)
Sulfuros	HACH- Método Azul de metileno (8196)
Carbohidratos	Método de DuBois

4.2 Etapa 2: Instalación del sistema experimental e inoculación de los filtros

Como características generales, el sistema experimental estuvo constituido por tres columnas de acrílico transparente de 1 m de altura, 8 cm de diámetro y 5 L de volumen total, las cuales operaron como FAFA con recirculación ($120 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). El medio de soporte de la biomasa empleado para los filtros fueron cubos de PU (Figura 8a) con un área superficial de contacto de $900 \text{ m}^2\cdot\text{m}^{-3}$, los cuales fueron empacados en los filtros a una altura/volumen de lecho del 70% (3.5 L) del filtro (de acuerdo con Nunes *et al.*, 2015; Marques *et al.*, 2015; y Buitrón *et al.*, 2014), resultando un área superficial de contacto total (por filtro) de 3.12 m^2 . Se instalaron bombas peristálticas a cada filtro para su alimentación y recirculación. Asimismo, cada filtro contó con una cúpula en la parte superior para la acumulación del biogás, una válvula que fue conectada a una bolsa *Tedlar* (Figura 12a) de 5 L para la captación del mismo. Los filtros fueron instalados en un cuarto de incubación con el objeto de mantener una temperatura mesófila de 35°C aproximadamente. En la Figura 7 se muestra una imagen del sistema experimental de manera individual, teniendo en cuenta que los tres filtros tuvieron el mismo diseño.

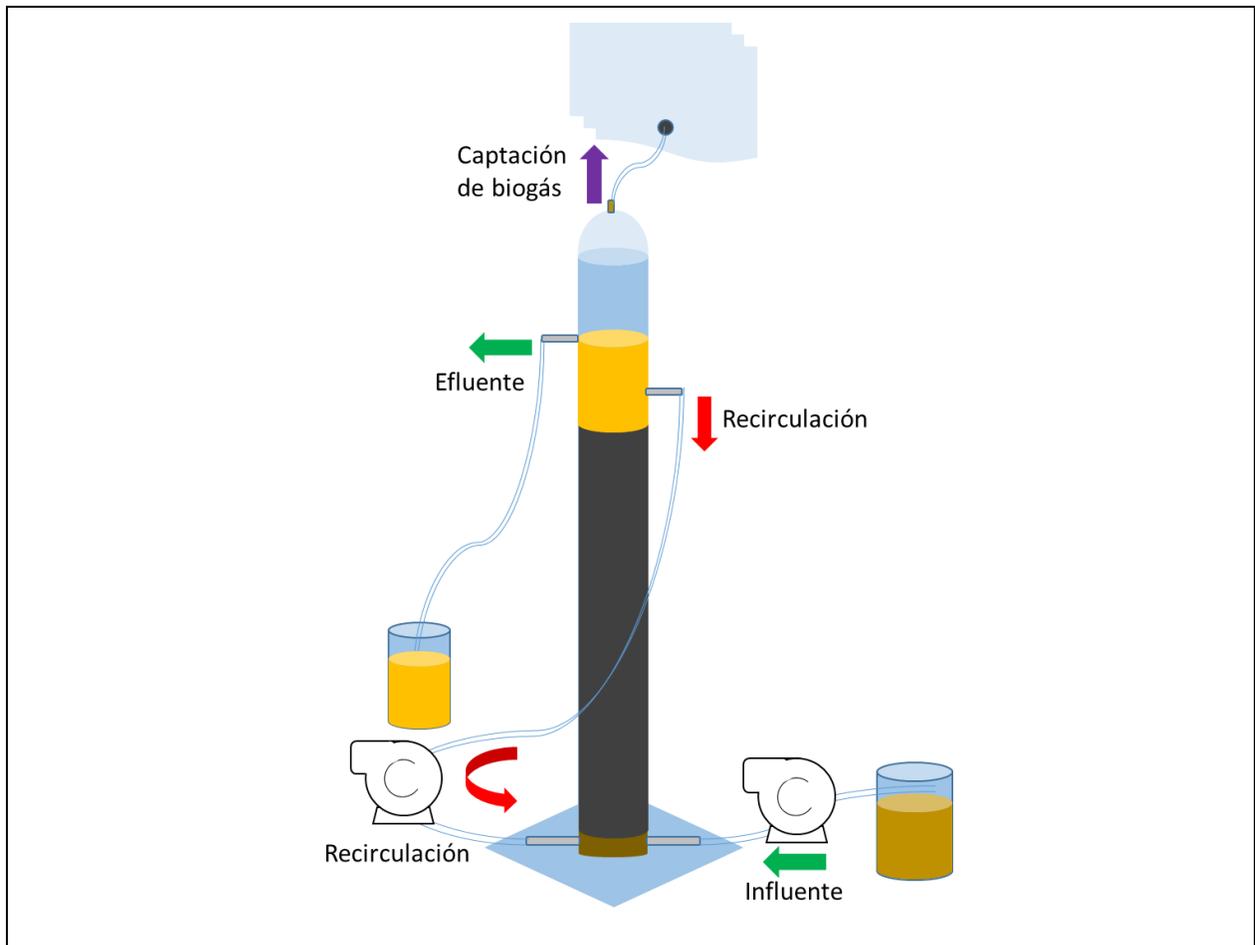


Figura 7. Diseño del sistema experimental de manera individual

El LGA (Figura 8b) empleado como inóculo provino de un reactor UASB de una industria del reciclaje de cartón.

Como características específicas, el primer filtro (F1-VC) consistió en un FAFA que fue utilizado en un estudio previo para el tratamiento de vinaza tequilera y producción de metano, por lo que el filtro ya se encontraba inoculado con 1 L de LGA molido y 921 cubos de PU, aclimatado, y operando bajo condiciones de digestión anaerobia. Con el objetivo de evaluar la posibilidad de producir hidrógeno a partir de un filtro con estas características iniciales, se propiciaron las condiciones de fermentación oscura, lo cual consistió únicamente en disminuir el pH en el sustrato influente de pH 7 a 4 unidades.

El segundo y tercer filtro (F2-ISP y F3-IPT, respectivamente) fueron inoculados y empacados de manera inicial para la presente investigación. Para el F2, el LGA fue previamente molido y tamizado, con el fin de obtener un diámetro menor de 0.5 mm. En el caso de F3, con el objetivo de inhibir la actividad de las bacterias consumidoras de hidrógeno y propiciar la esporulación de las bacterias acidogénicas, el LGA fue sometido a un pretratamiento térmico en el horno a 105°C durante 21 h, y posteriormente, el LGA pretratado fue molido y tamizado para obtener el mismo diámetro (<0.5 mm). F2 y F3 también fueron empacados con 921 cubos de PU y 1 L LGA.



Figura 8. a) *Cubo de poliuretano utilizado como medio de soporte para la biomasa en los reactores; b)* *Biomasa empleado en la investigación*

Previo a la inoculación y/o arranque de los filtros, se realizó una búsqueda de diferentes técnicas utilizadas por distintos autores, para determinar las condiciones del pretratamiento térmico de la biomasa para inocular el F3. En la Tabla 5 se muestra un resumen de las fuentes consultadas, de las cuales se eligieron las técnicas realizadas por Buitrón y Carvajal (2010), Buitrón *et al.*, (2014) y

Albarrán (2017) (resaltadas en amarillo), debido a que en sus investigaciones obtuvieron RH y TPH altos con cultivos mixtos (sin necesidad de realizar un aislamiento en un cultivo puro, como en el estudio de Marques *et al.*, 2015), además de la similitud con la presente investigación, donde también utilizaron filtros tipo FAFA para la producción de hidrógeno a partir de vinaza tequilera. El siguiente paso fue la aplicación del pretratamiento térmico a 1 L de LGA, con un tiempo de reacción de 21 h. Posteriormente, el LGA pretratado (Figura 9a) fue molido (Figura 9b) y tamizado (Figura 9c) hasta obtener un diámetro menor a 0.5 mm (Fernández-Polanco y Seghezzeo, 2015) para garantizar que los flóculos estuvieran en suspensión y fuera más fácil la formación de la biopelícula. Para F2, de igual manera se tomó 1 L de LGA, se molió y se tamizó (al mismo diámetro) en estado húmedo. Una vez molidos y tamizados los inóculos, fueron mezclados con 921 cubos de poliuretano y agregados a cada filtro. Por último, los tres filtros fueron alimentados con vinaza tequilera diluida con agua de grifo a una COV de $1 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$ para que los microorganismos asimilaran la materia orgánica poco a poco y no presentara una sobrecarga para los sistemas (Albanez *et al.*, 2018; Zampol *et al.*, 2014; Buitrón y Carvajal, 2010); y un pH de 4 unidades (para comenzar la aclimatación). En la Figura 10 se muestra un resumen de la metodología utilizada para la inoculación y arranque de los sistemas.

Tabla 5. Revisión bibliográfica para selección del método de pretratamiento térmico de la biomasa

Autor	Temp. (°C)	Tiempo	Equipo	TPH (L H₂·L⁻¹d⁻¹)	RH (mL H₂·gDQO⁻¹)	Cultivo
Buitrón y Carvajal (2010)	104	24 h	Horno	1.21	202	Mixto
González-Ugalde y Durán-Herrera (2013)	100	30 min	Baño María	0.32	8	Mixto
Zampol <i>et al.</i> , (2014)	90	10 min	Baño María	0.25	63	Puro
Buitrón <i>et al.</i> , (2014)	104	24 h	Horno	1.73	194	Mixto
Marques <i>et al.</i> , (2015)	90	15 min	Baño María	13.68	517	Puro
Albarrán (2017)	104	24 h	Horno	1.22	47	Mixto

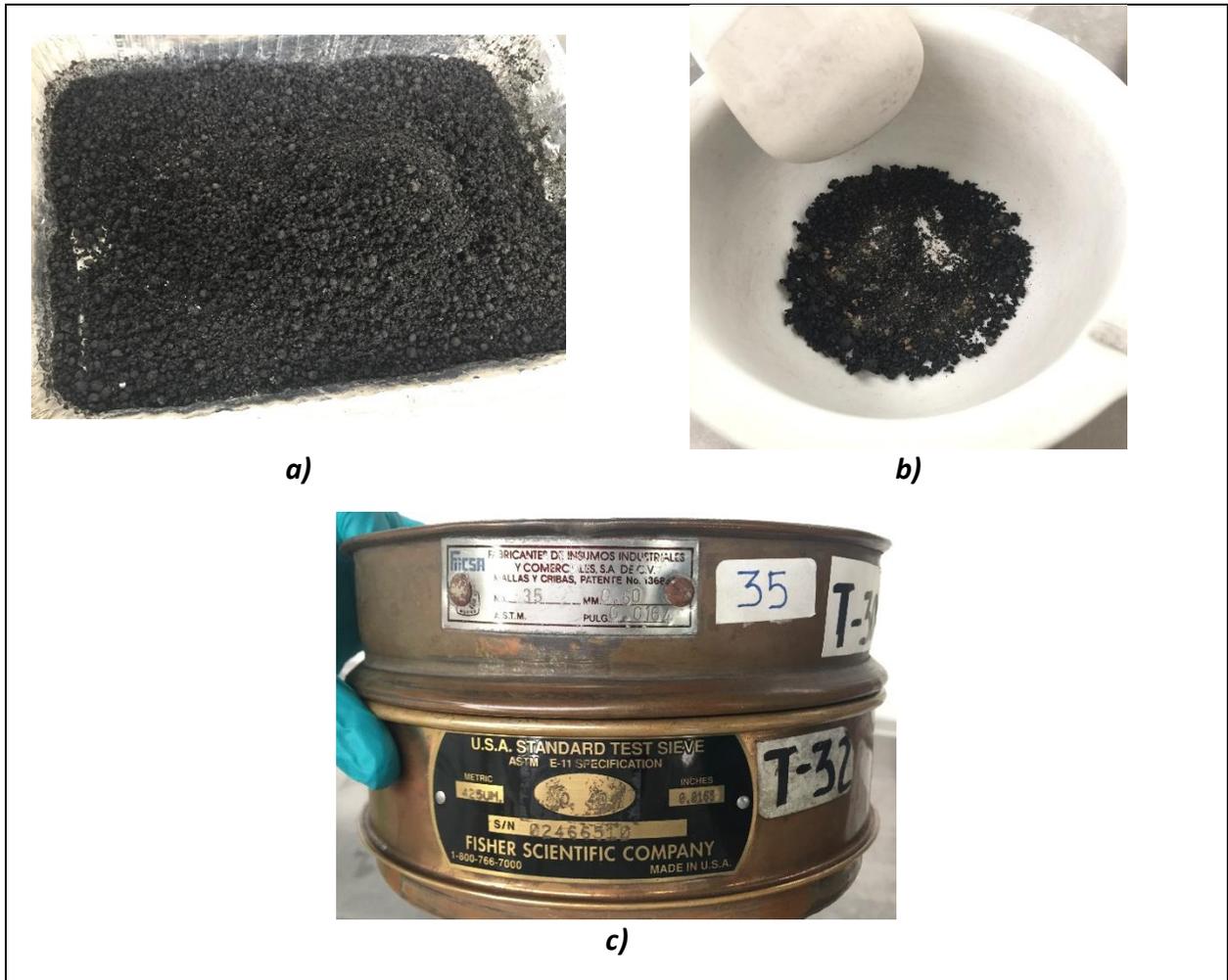


Figura 9. a) LGA pretratado térmicamente; **b)** LGA molido después de pretratamiento; **c)** Tamices utilizados para la reducción de tamaño del LGA

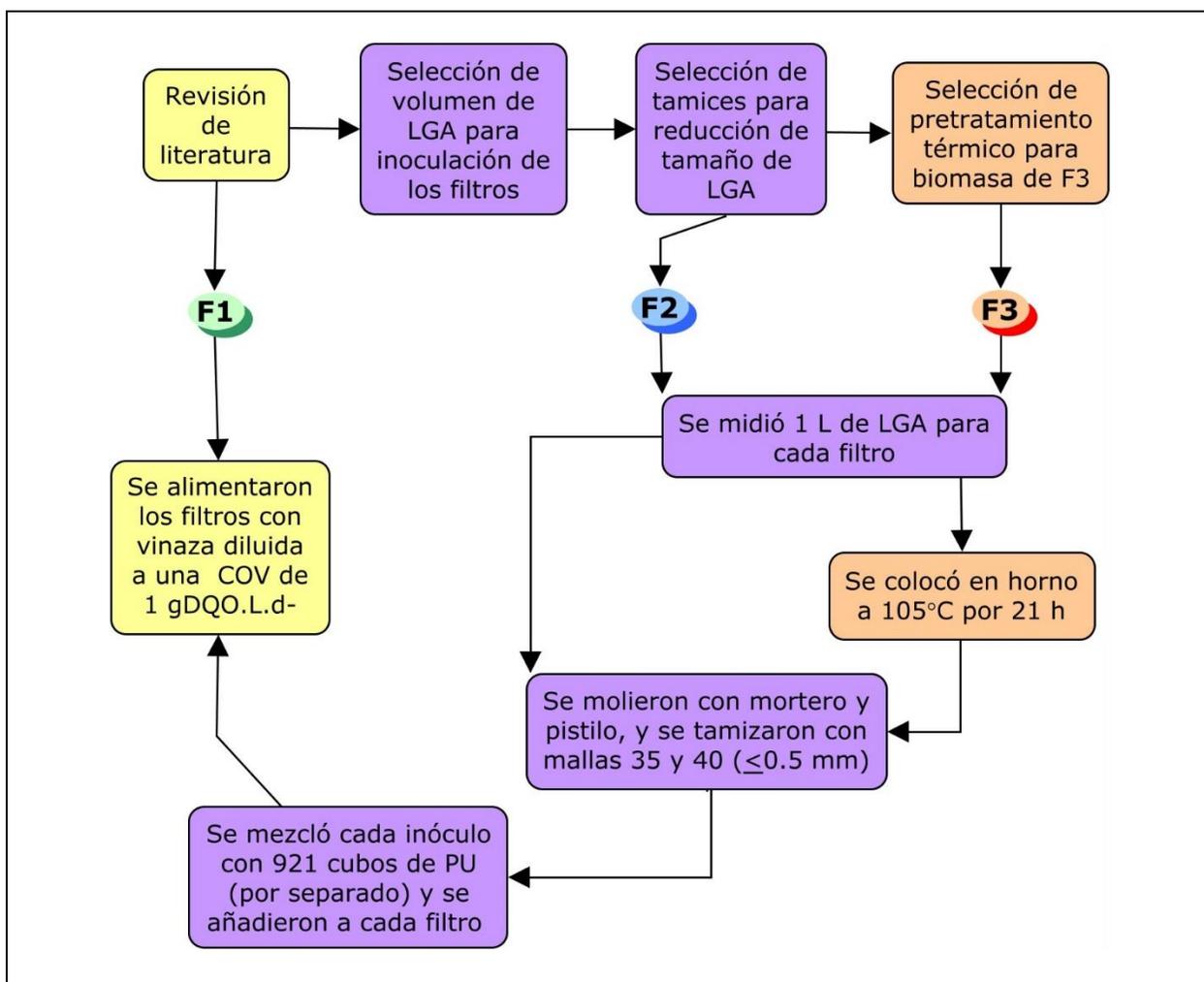


Figura 10. Metodología implementada para la inoculación y/o arranque de los filtros

4.3 Etapa 3: Estabilización de los sistemas en régimen batch

Una vez inoculados los filtros, se comenzó con la operación en régimen batch (Figura 11) con el fin de comenzar con el desarrollo de la biopelícula y su posterior estabilización (F2 y F3). En el caso del F1, únicamente fue operado para su estabilización. Se utilizó un TRH teórico (determinado mediante la fórmula general $TRH = \frac{V}{Q}$) de 70 h y se realizó un incremento moderado de la COV desde $1 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ hasta alcanzar la aclimatación de la biomasa en $9 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (107 días), basado en la estabilización de la remoción de DQO. Durante esta etapa se monitorearon los parámetros pH, ORP, DQO, biogás producido, nitrógeno amoniacal, sulfuros, alcalinidad y AGV.



Figura 11. Filtros inoculados en etapa de estabilización

4.4 Etapa 4: Pruebas experimentales en régimen continuo

Una vez que los filtros presentaron una estabilización con respecto a los parámetros monitoreados (principalmente la DQO), los sistemas se modificaron y comenzaron a operar en régimen continuo, para posteriormente, llevar a cabo las dos fases experimentales. Durante esta etapa, los filtros fueron sometidos a dos diferentes TRH teóricos (10 y 5 h), debido a que hasta el 2020 aún no se reportaron estudios con estos TRH; mientras que la COV se mantuvo en $14.5 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (COV ajustada de acuerdo con las limitaciones de volumen disponible de vinaza). Asimismo, se monitorearon los parámetros mostrados en la Tabla 6 junto con la frecuencia de medición de estos y las técnicas empleadas. En la Tabla 7 se muestran los parámetros operacionales que se variaron durante la etapa de estabilización y la etapa de pruebas experimentales.

Tabla 6. Parámetros monitoreados durante la etapa experimental.

PARÁMETRO	TÉCNICA	FRECUENCIA DE MEDICIÓN
pH	APHA, 2012	Cinco veces por semana
OD (oxígeno disuelto)		
ORP		
Biogás producido	Desplazamiento de agua	
DQO	APHA, 2012	Tres veces por semana
Carbohidratos	Método de DuBois	
Alcalinidad	Titulación – Método potenciométrico	Dos veces por semana
AGV	Método de Jenkins	
Composición del biogás	Cromatografía de gases	
DBO ₅	APHA, 2012	Una vez por semana
Nitrógeno amoniacal	HACH - Método Nessler (8038)	
Sulfuros	HACH – Método Azul de metileno (8196)	

Tabla 7. Parámetros operacionales evaluados.

ETAPA	VARIABLE
ESTABILIZACIÓN (régimen batch)	TRH teórico (70 h)
	COV (1-9 gDQO·L ⁻¹ ·d ⁻¹)
EXPERIMENTACIÓN (régimen continuo)	TRH teórico (10 y 5 h)
	COV (14.5 gDQO·L ⁻¹ ·d ⁻¹)

4.4.1 Análisis del biogás

El análisis de la composición del biogás se realizó utilizando un cromatógrafo de gases SRI 8610 con detector de conductividad térmica (Figura 12), mediante la inyección de 1 mL de muestra. La columna utilizada fue Molecular Sieve 13X de 2.1 mm de diámetro interno, 6 ft de largo y malla 80/100. Se usó helio (INFRA) como gas acarreador a una presión de 60-80 psi. La temperatura de la columna, el horno y el inyector se mantuvo a 100°C. Previo a la medición de las muestras, se realizaron las curvas de calibración (ANEXO 1) de hidrógeno, metano y dióxido de carbono, para las cuales se inyectaron en el cromatógrafo de gases diferentes volúmenes (0.1-1 mL) de un estándar de los gases con concentración conocida.

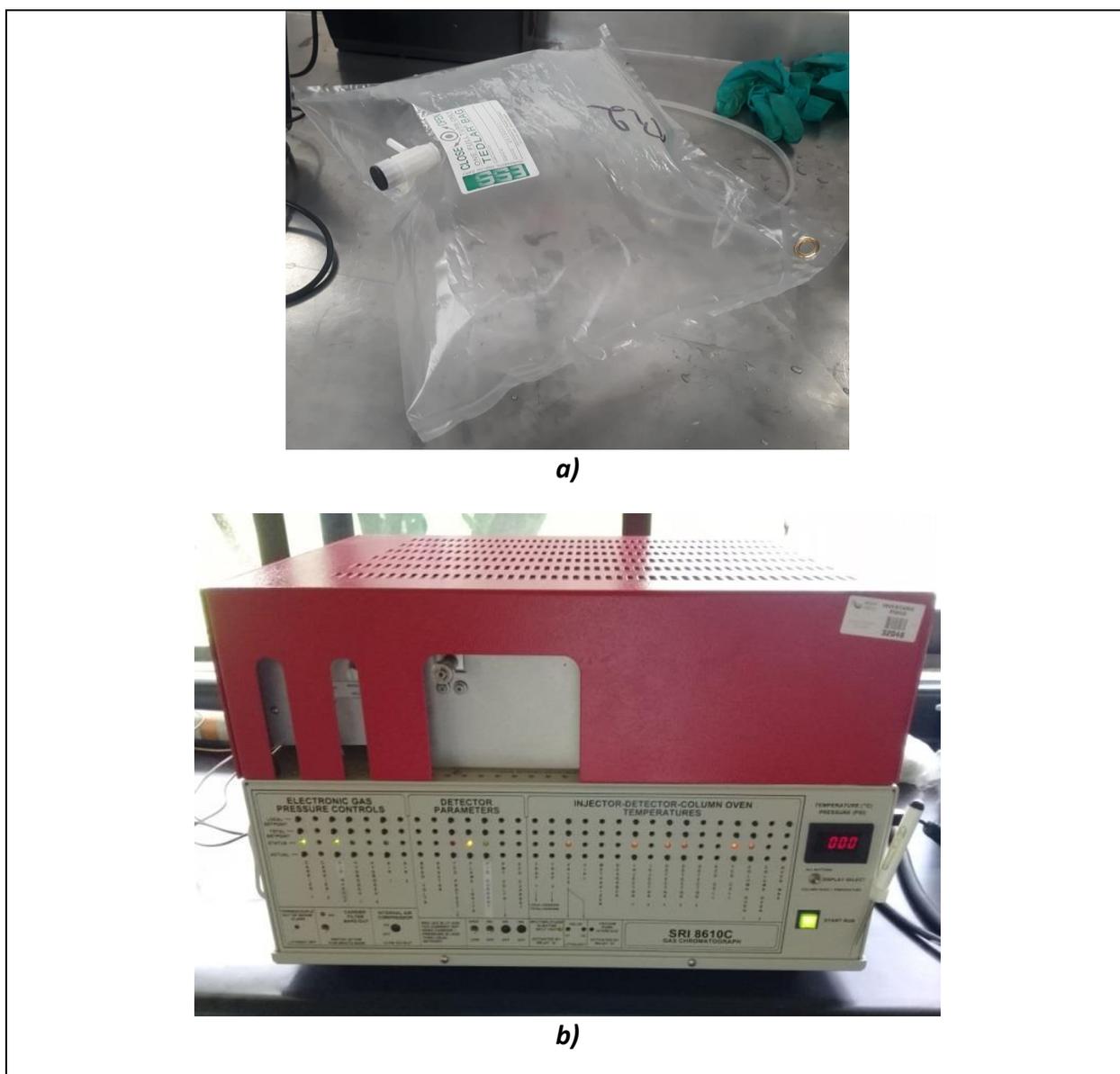


Figura 12. a) Bolsa Tedlar para la captura de biogás; **b)** Cromatógrafo de gases SRI 8610

4.5 Etapa 5: Cálculo de parámetros de respuesta y análisis estadístico

Tomando en cuenta la definición de TPH, que es el volumen de hidrógeno producido por unidad de tiempo y por unidad de volumen del reactor; y RH, que es el volumen de hidrógeno producido por masa de sustrato consumido (Blanco, 2013); se emplearon la Ecuación 3 (TPH) y Ecuación 4 (RH) para el cálculo de dichos parámetros.

$$TPH = \frac{Q_B \cdot \left(\frac{CHB}{100}\right)}{V_R}$$

Ecuación 3. Fórmula para calcular la TPH

$$RH = \frac{Q_B \cdot \left(\frac{CHB}{100}\right) \cdot 1000}{(S_0 - S) \cdot Q}$$

Ecuación 4. Fórmula para calcular el RH

Donde:

TPH = Tasa de producción de hidrógeno ($L\ H_2 \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$)

Q_B = Biogás producido ($L \cdot d^{-1}$)

CHB = Concentración de hidrógeno en el biogás (%)

V_R = Volumen total del reactor (L)

RH = Rendimiento de hidrógeno ($mL\ H_2 \cdot gDQO_{removida}^{-1}$)

S_0 = DQO en el influente ($g \cdot L^{-1}$)

S = DQO en el efluente ($g \cdot L^{-1}$)

Q = Caudal de alimentación ($L \cdot d^{-1}$)

Debido a que el volumen de un gas es dependiente de la temperatura y presión en donde se encuentra, una vez calculados los parámetros de respuesta, se procedió a realizar la normalización de éstos, es decir, a condiciones ambientales estándar ($T = 0^\circ C$ o $273.15^\circ K$ y $P = 1$ atm). Para esto, se empleó la ecuación de los gases ideales (Ecuación 5), que, al despejarla para determinar el número de moles, quedó de la siguiente manera:

$$n = \frac{P \cdot V(\text{TPH o RH})}{R \cdot T}$$

Ecuación 5. Fórmula de los gases ideales

Donde:

n = Número de moles del gas (mol)

P = Presión absoluta (1 atm)

V = Volumen del gas (TPH o RH en L)

R = Constante de los gases ideales (0.08206 atm·L·mol⁻¹·K⁻¹)

T = Temperatura absoluta (273.15°K)

Por último, después de calcular el número de moles de hidrógeno a condiciones estándar para cada parámetro (TPH y RH), estos se convirtieron nuevamente en términos volumétricos, utilizando la densidad y peso molecular del hidrógeno gas, así como la Ecuación 6.

$$\text{TPH o RH (N)} = \frac{n \cdot PM}{\rho}$$

Ecuación 6. Fórmula para normalización de la producción de hidrógeno

Donde:

TPH o RH (N) = Valores normalizados (TPH = NL H₂·L⁻¹·d⁻¹; RH = NmL H₂·gDQO_{removida}⁻¹)

PM = Peso molecular del hidrógeno gas (2.0157 g·mol⁻¹)

ρ = Densidad del hidrógeno gas (0.071 g·L⁻¹)

Para las pruebas experimentales se realizó un diseño de experimentos que consistió en un diseño 3x2, donde se estudiaron las condiciones de arranque F1 (VC), F2 (ISP) y F3 (IPT); y la influencia del TRH en dos niveles (10 y 5 h), con el fin de evaluar sus efectos en la producción de hidrógeno. Al tener dos factores con tres y dos niveles, respectivamente, y ocho mediciones por cada combinación, se obtuvo un total de 48 datos. Las variables no controladas fueron la concentración de carbohidratos, AGV, sulfuros y nitrógeno amoniacal en la vinaza de estudio. Se realizó un análisis estadístico mediante Excel (ANEXO 2) para evaluar la mejor condición de arranque y TRH con respecto a los parámetros de respuesta (CHB, TPH y RH). Dicho análisis consistió primeramente en un ANOVA para determinar si existían diferencias entre las medias poblacionales de los datos, y posteriormente, un análisis LSD (Diferencia Mínima Significativa, por sus siglas en inglés) para determinar si las diferencias encontradas fueron o no significativas. Por

último, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple con el que se obtuvo el TRH y condición de arranque óptimos para maximizar las respuestas.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Caracterización de la vinaza

En la Tabla 8 se presentan los rangos de valores obtenidos de los parámetros fisicoquímicos analizados en la vinaza tequilera durante todo el periodo experimental. Como resultado se comprueba el alto poder contaminante que posee la vinaza tequilera, ya que se obtuvo un pH ácido (3.63-3.64 unidades) y un alto contenido de materia orgánica (DQO de 21,768-45,894 mg·L⁻¹ y DBO₅ de 12,125-22,189 mg·L⁻¹), las cuales son similares a los valores reportados por Estrada-Arriaga *et al.*, (2021), Retes (2014), López *et al.*, (2010), Íñiguez y Hernández (2010), y Robles y Villalobos (2009). Estos valores no cumplen con los LMP establecidos en la NOM-001-SEMARNAT-1996 que regula los contaminantes en las descargas de agua a cuerpos receptores, los cuales son 6.5-8.5 unidades para pH y 200 mg·L⁻¹ para DBO₅.

En cuanto a los valores de nitrógeno amoniacal (396-438 mg·L⁻¹) y sulfuros (3.08-4.78 mg·L⁻¹) determinados en la vinaza, se demuestra que no presentan un riesgo de inhibición para el proceso anaerobio, ya que la máxima concentración aceptada de estos compuestos para un adecuado funcionamiento sin inhibición es de 1,500 y 200 mg·L⁻¹, respectivamente (Fernández-Polanco y Seghezzeo, 2015).

La concecntración de SST, SSV y SSF presente en la muestra de vinaza fue de 3,693-6,586; 3,392-6,100; y 301-486 mg·L⁻¹, respectivamente, lo cual podría corresponder a la vinaza sólida no triturada completamente y a complejos orgánicos producidos en la fermentación de las piñas de agave. A causa de la elevada concentración de SS presente en las vinazas tequileras y a la diversidad en su naturaleza química, se hace evidente el necesario tratamiento de sedimentación para la reducción de las partículas suspendidas en el medio. Además, se puede apreciar cómo solo una pequeña fracción de los SS corresponden a los SSF, lo cual se debe a que la mayor fracción de SS corresponde a productos orgánicos, puesto que la materia prima para elaborar el tequila es el agave.

Tabla 8. Caracterización fisicoquímica de la vinaza tequilera empleada en la investigación.

PARÁMETRO	VALOR	PARÁMETRO	VALOR
pH (unidades)	3.63-3.64	Nitrógeno amoniacal (mg·L ⁻¹)	396-438
ORP (mV)	142-186	Sulfuros (mg·L ⁻¹)	3.08-4.78
DQO (mg·L ⁻¹)	21,768-45,894	Sulfatos (mg·L ⁻¹)	57-120
DBO ₅ (mg·L ⁻¹)	12,125-22,189	Carbohidratos (mg glucosa·L ⁻¹)	8,272-18,358
ST (mg·L ⁻¹)	17,916-31,947	SST (mg·L ⁻¹)	3,693-6,586
STV (mg·L ⁻¹)	16,415-29,520	SSV (mg·L ⁻¹)	3,392-6,100
STF (mg·L ⁻¹)	2,427-3,693	SSF (mg·L ⁻¹)	301-486

5.2 Operación y monitoreo de los filtros durante la etapa de estabilización

A continuación, se presenta el comportamiento de los parámetros monitoreados en los tres filtros durante 107 días de la etapa de estabilización.

5.2.1 Carga orgánica volumétrica (COV)

En la Figura 13 se muestra el aumento de la COV durante la etapa de estabilización, partiendo desde 1 (COV baja, para que los microorganismos asimilaran la materia orgánica poco a poco, y no presentara una sobrecarga para los sistemas) hasta llegar a 9 gDQO·L⁻¹·d⁻¹ (COV cercana a la COV mantenida durante la experimentación), de acuerdo con Albanez *et al.*, (2018), Zampol *et al.*, (2014) y Buitrón y Carvajal, (2010). Estas COV fueron ajustadas realizando diluciones vinaza/agua, partiendo de la DQO inicial medida en la vinaza cruda. El factor determinante para aumentar las COV fue la obtención de valores de remoción de DQO superiores a 37% (Nunes *et al.*, 2015). La duración de esta etapa fue un total de 107 días. Se presentó una disminución de la COV entre los días 70 y 90, debido a un inconveniente con el cambio de lote de vinaza.

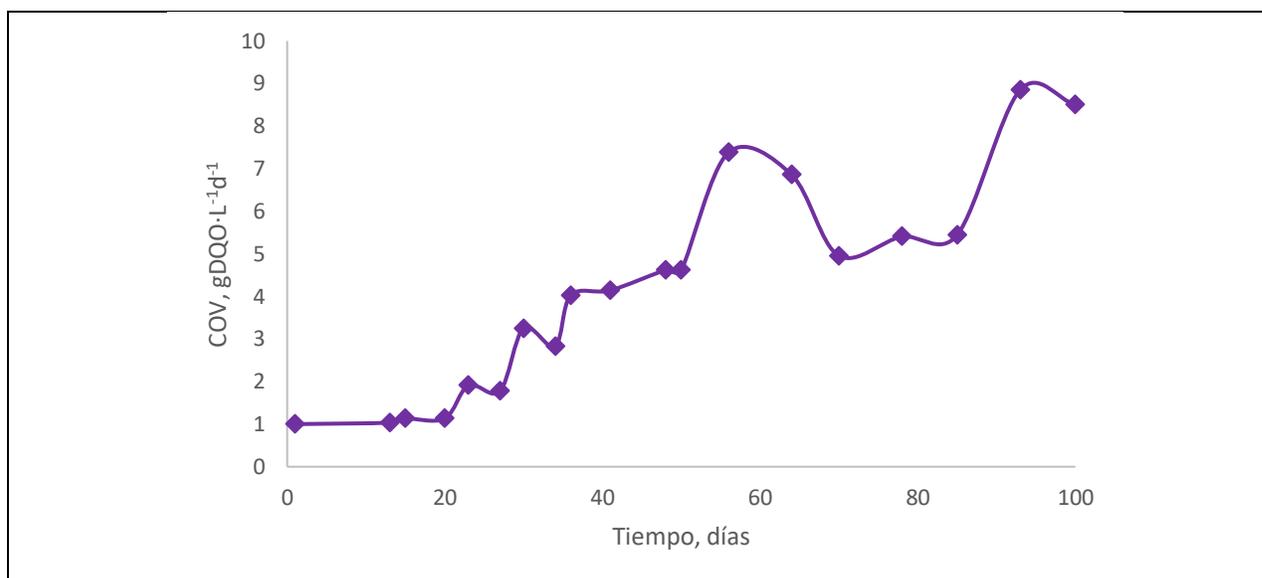


Figura 13. COV utilizada en los filtros durante la etapa de estabilización

5.2.2 pH

La Figura 14 muestra el comportamiento del pH. Se observa que el filtro que presentó mayor estabilización a este parámetro fue el F2, con una tendencia hacia el decremento bastante notoria y con valores en un rango adecuado para la producción de hidrógeno a partir del día 36, presentando valores entre 6.01 y 4.1 unidades. Esto puede atribuirse a que este filtro fue alimentado con pH 4 unidades desde el inicio de su operación, sin ningún pretratamiento de la biomasa. Se observó también que el F1 mostró gran variación, presentando valores entre 8 y 5.7 unidades, los cuales permanecieron la mayor parte de esta etapa fuera del rango óptimo para la fermentación oscura, encontrándose dentro del rango solamente entre los días 48 y 96. Esto puede ser atribuido principalmente a una alta alcalinidad dentro del filtro, generada por las condiciones anteriores de digestión anaerobia en las cuales se encontraba el sistema y las cuales pudieron estar aún presentes en el empaque del filtro, y por tanto, dichas condiciones pudieron mantener una elevada alcalinidad debido a la producción mayoritaria de metano y dióxido de carbono por las bacterias metanogénicas, lo cuál debe comprobarse en el análisis de la composición biogás. En cuanto al F3, se notó un comportamiento estable a lo largo de casi toda la etapa, mostrando valores entre 7.43 y 5.81 unidades, estando en el límite superior del rango óptimo necesario para la fermentación. Esto pudo deberse a un aumento de pH ocasionado por el proceso anammox, el cuál se explica en el apartado 5.2.5. En general, el comportamiento del pH en los tres filtros indicó que la biomasa se aclimató paulatinamente al sustrato, presentando valores adecuados (4-6 unidades) para la acidogénesis y producción de hidrógeno (Bittencourt *et al.*, 2014; Arreola-Vargas *et al.*, 2013; Espinoza-Escalante *et al.*, 2009).

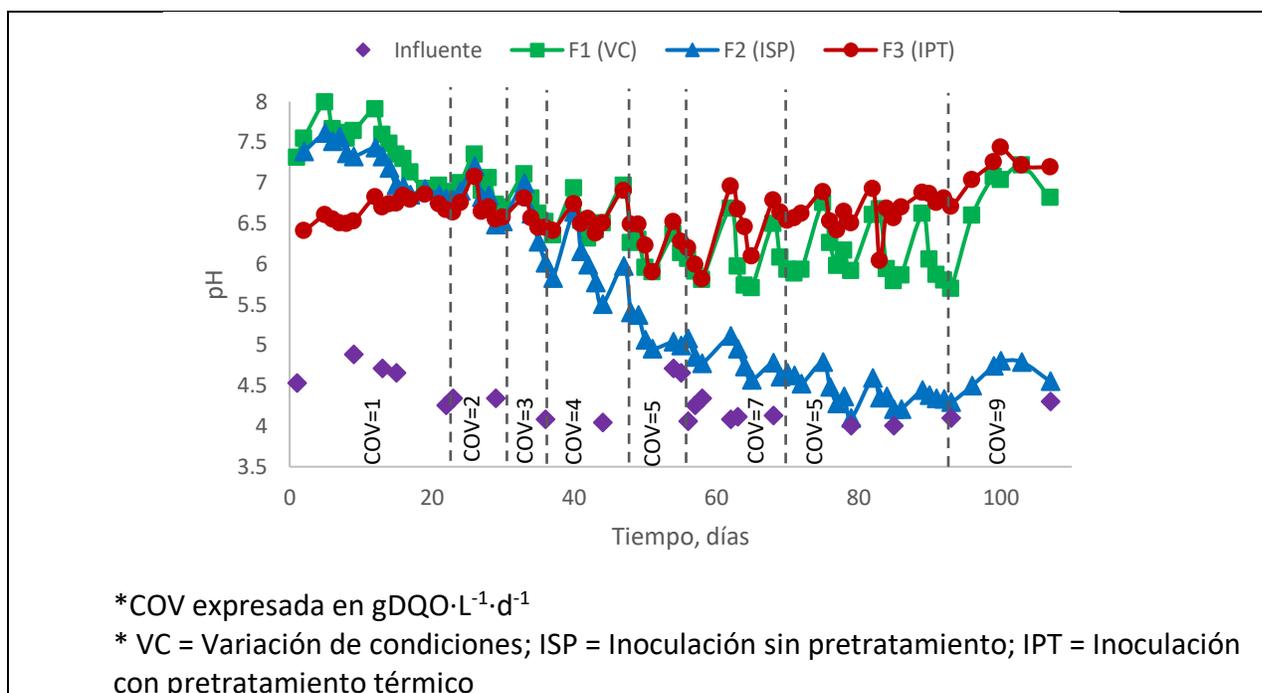


Figura 14. Comportamiento del pH en los filtros durante la etapa de estabilización

5.2.3 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La Figura 15 muestra el comportamiento de la DQO en los tres filtros durante la etapa de estabilización, de la cual se observa como la DQO en el influente fue en aumento ($2,933\text{-}25,937 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de acuerdo al incremento de la COV. La DQO en el efluente de los filtros también tuvo un aumento conforme se aumentó la COV, pues esta se encuentra ligada a la remoción de DQO. Durante los primeros 41 días de operación (COV de 1 a $4 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), los efluentes de los filtros presentaron valores de DQO más bajos y similares entre sí, en un rango de 177 a $3,631 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir del día 48 y hasta finalizar esta etapa, con la COV de 5 a $9 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, el efluente del F3 presentó valores menores de DQO ($6,466\text{-}1,540 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) con respecto a los otros dos reactores (F1= $5,688\text{-}14,491 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; F2= $6,485\text{-}18,248 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), a pesar del aumento en la COV, lo cual puede atribuirse a una baja producción de AGV y alta conversión de acetato, ya que el pH de este reactor presentó valores (6-7.5 unidades) cercanos a los establecidos para la ruta metabólica de la metanogénesis, dónde sucede esto (Espinoza-Escalante *et al.*, 2009).

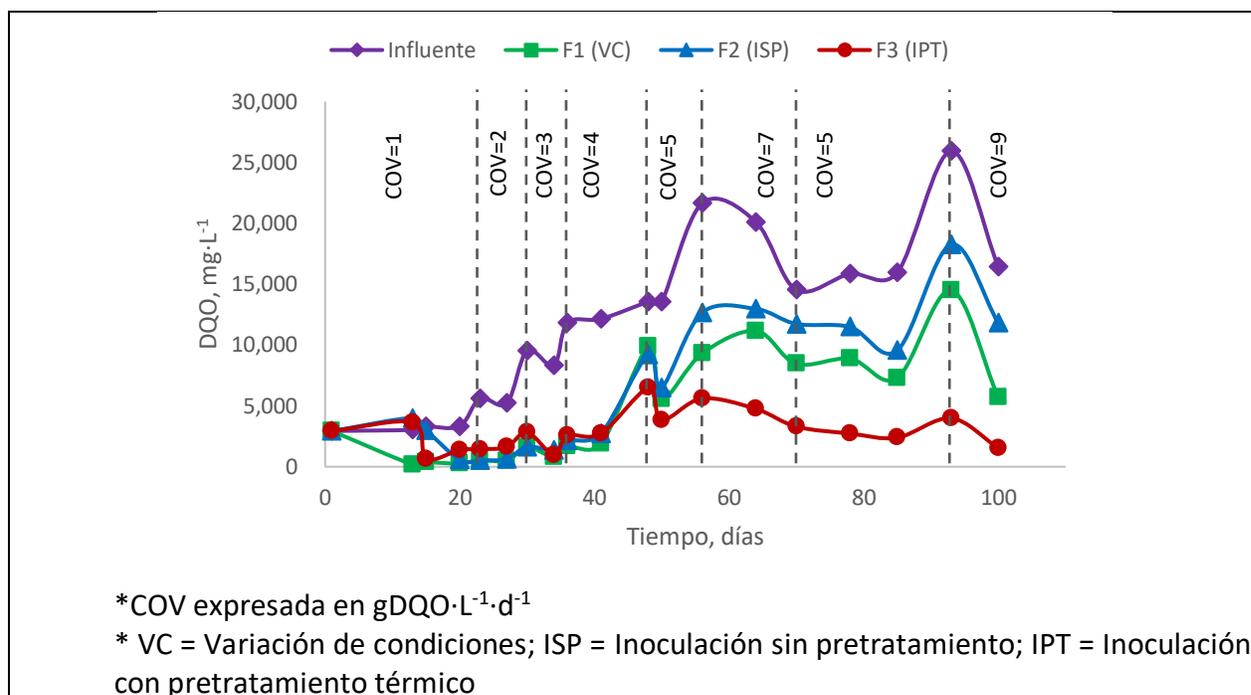


Figura 15. Comportamiento de la DQO en los tres filtros durante la etapa de estabilización

En la Figura 16 se presentan las eficiencias de remoción de DQO en los filtros. El filtro que presentó los valores más altos de remoción de DQO (94-84%) fue el F1 durante los primeros 40 días de experimentación, esto probablemente debido a que la biomasa ya operaba anteriormente para la producción de metano y por ende ya se encontraba aclimatada a esa COV. Sin embargo, a partir del día 48 de operación, con COV de 5-9 gDQO·L⁻¹·d⁻¹, se hizo notoria una mayor estabilidad en la remoción de DQO y una mayor diferencia entre los tres filtros, siendo el F3 el que presentara las mejores eficiencias de remoción, con valores entre 72 y 91%, mientras que el F2 fue el que presentó los valores más bajos de remoción (19-52%), lo cual pudo deberse posiblemente a que desde su inoculación este reactor fue alimentado con sustrato a pH 4 unidades, lo que hizo que entrara más rápido en condiciones acidogénicas, las cuales interrumpen la ruta metabólica de la digestión anaerobia y a su vez disminuyen la eliminación de AGV, haciendo que la DQO en el efluente no disminuyera considerablemente. De igual manera, a partir del día 48 el F1 presentó un comportamiento similar al F2, presentando valores ligeramente mayores (27-65%). Los valores de remoción en los sistemas F1 y F2 fueron similares a los reportados por Buitrón *et al.*, (2014), Albanes *et al.*, (2018), Buitrón y Carvajal (2009), Nunes *et al.*, (2015) y González-Ugalde y Durán-Herrera (2013), que muestran remociones entre 19 y 37% durante la producción de hidrógeno. Sin embargo, los valores presentados por el F3 son casi dos veces mayor a los reportados. Esto, en conjunto con los valores de pH registrados (5.81-7.43 unidades), indican que posiblemente aún no fueron alcanzadas las condiciones acidogénicas, pues tanto el pH como la remoción de DQO son mayores a las reportadas en la bibliografía; dejando la posibilidad de que se estuvieran completando algunas rutas metabólicas de la metanogénesis, donde el pH y la remoción de DQO son similares a los obtenidos por este filtro. No obstante, al ser esta etapa únicamente de aclimatación (régimen batch) y, por ende, más inestable, se debe esperar a observar los valores

obtenidos en la etapa de experimentación (régimen continuo), pues en estas condiciones es cuando los sistemas presentan mayor estabilidad (Shan-Fei *et al.*, 2017).

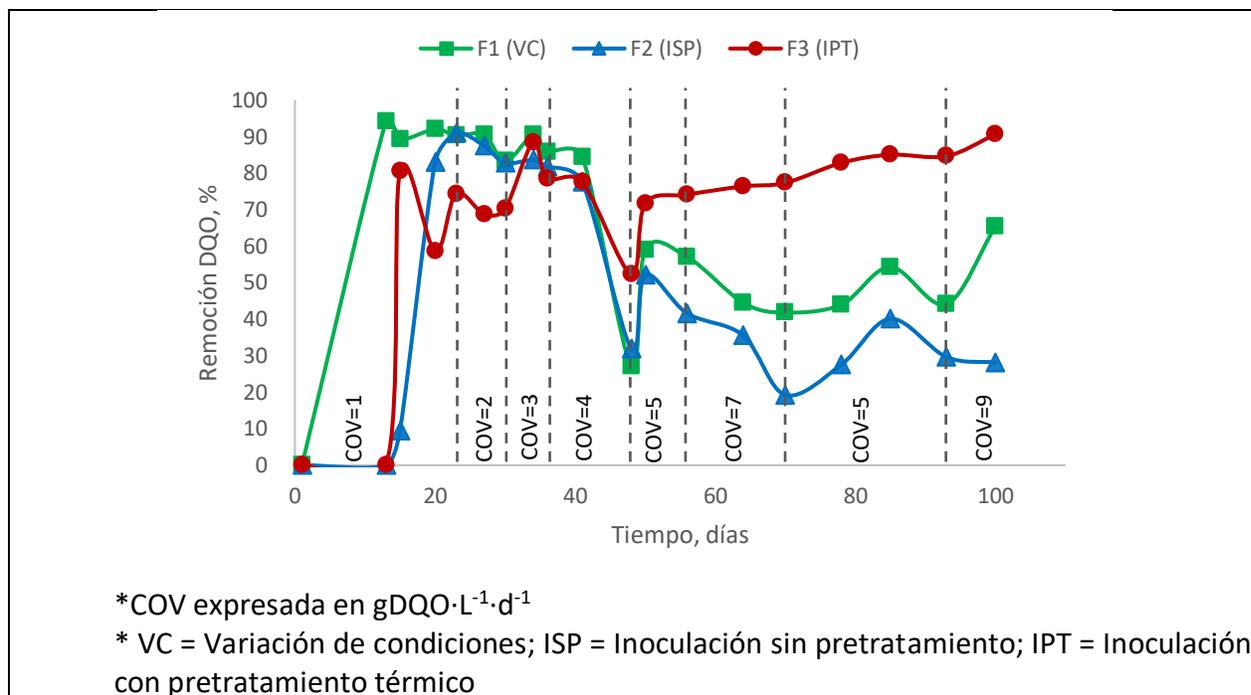


Figura 16. Eficiencia de remoción de DQO en los filtros durante la etapa de estabilización

5.2.4 Producción y composición del biogás

En la Figura 17 se muestra la producción de biogás en los tres filtros durante la etapa de estabilización, haciéndose notorio que el F3 fue el filtro con la mayor producción en casi toda la etapa, comparado a los otros dos filtros, presentando valores de hasta $5.7 \text{ L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ durante la COV de $9 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; a diferencia del F1 y F2, con una producción máxima de 2.5 y $1.3 \text{ L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectivamente. Esto puede atribuirse a que, como se explicó, los valores de pH y DQO confirman que algunas rutas metabólicas de la metanogénesis se estuvieron completando, por lo cual la producción de biogás aumentó junto con la remoción de DQO, pues al haber una mayor remoción de materia orgánica significó que existió una fracción mayor disponible para la conversión a biogás.

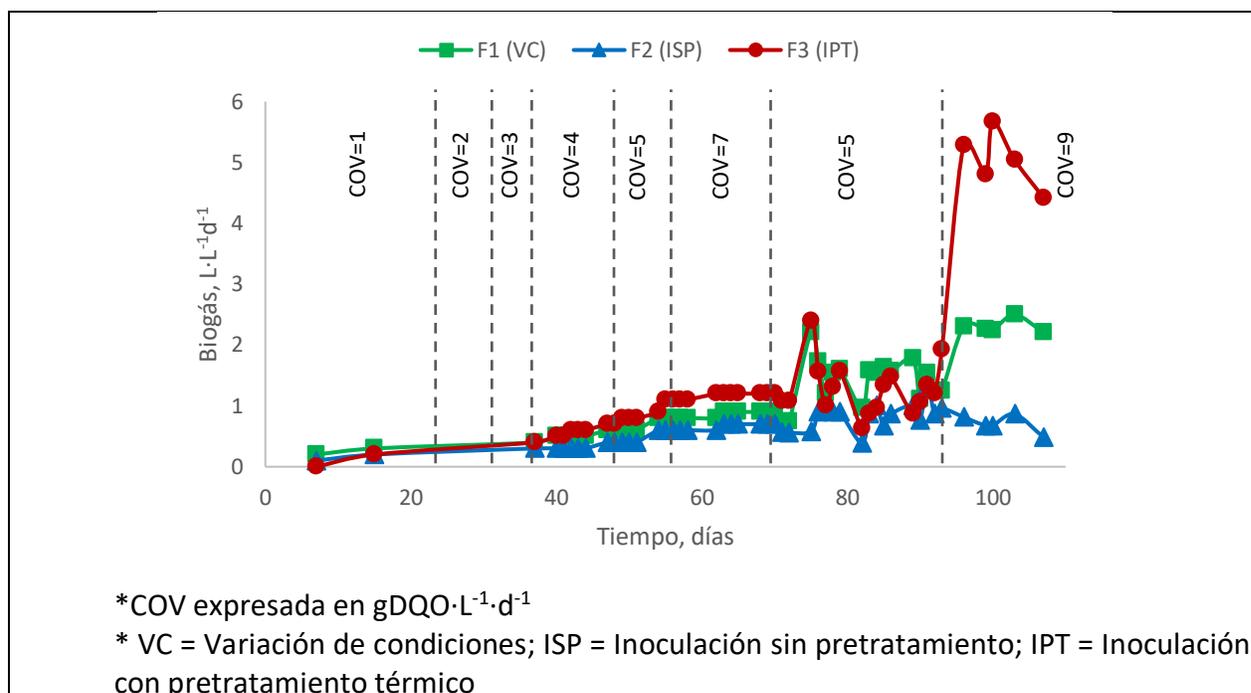


Figura 17. Producción de biogás en los filtros durante la etapa de estabilización

En el día 7 de operación se realizó el análisis de la composición del biogás del F1 (Figura 18a) y F2 (18b). El F3 no produjo biogás hasta el día 15. En esta figura se observó que, desde el día 7 de operación, F1 y F2 ya producían hidrógeno en una mayor proporción al metano y dióxido de carbono.

El CHB que se determinó en el análisis cromatográfico de las muestras de biogás del F1 y F2 fue de 67 y 51%, respectivamente; concordando con los valores reportados por Buitrón y Carvajal, (2009); Buitrón *et al.*, (2014); Marques *et al.*, (2015); y Albarrán, (2017), entre 34 y 64%. Estos valores demostraron una buena eficiencia del proceso, ya que la mayoría de los productos intermedios producidos en la fermentación fueron convertidos en hidrógeno.

Durante el resto de la operación de los sistemas no se determinó la composición del biogás, debido a problemas con el equipo de detección.

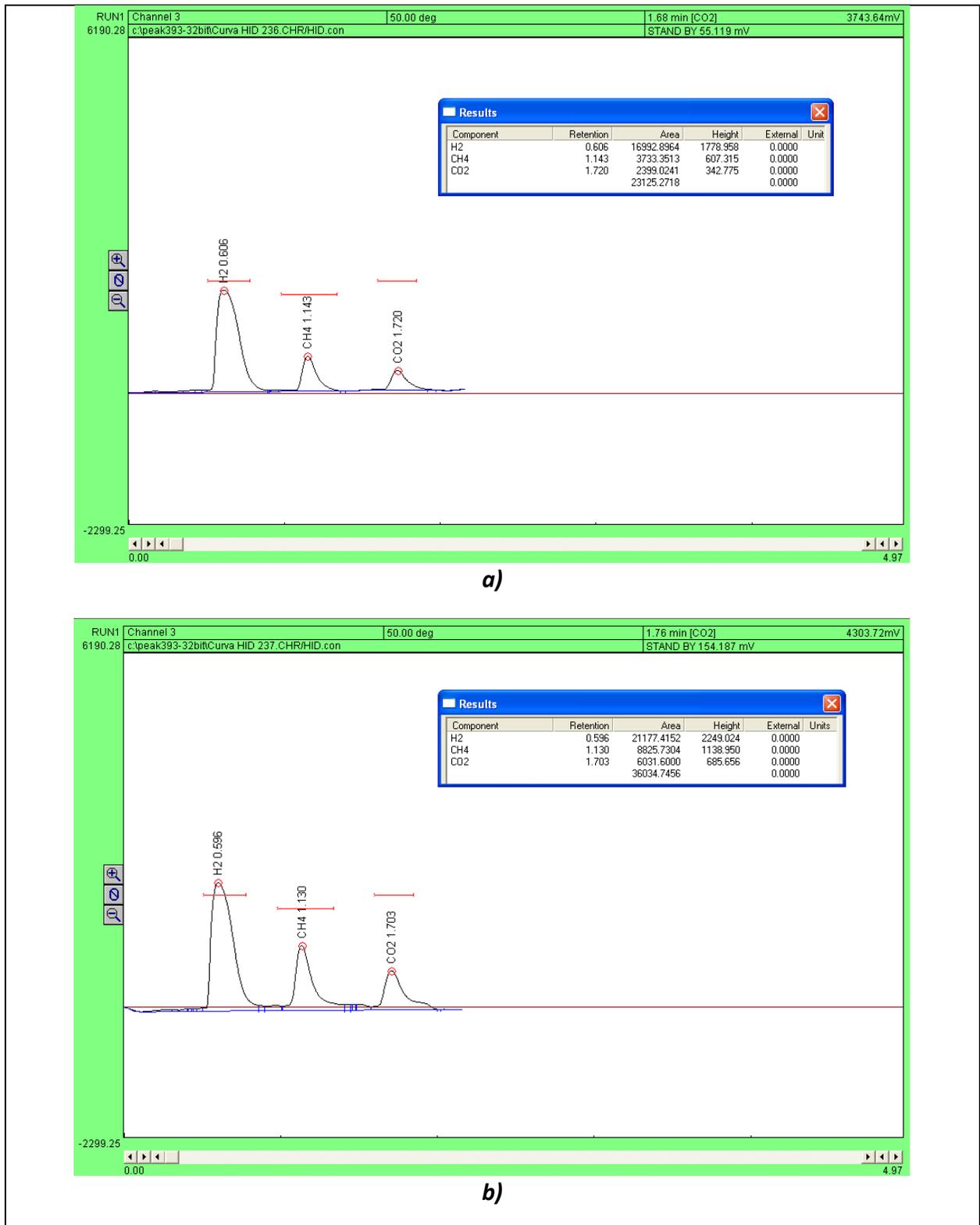


Figura 18. Cromatogramas obtenidos en el análisis de la composición del biogás mediante cromatografía de gases para a) F1 y b) F2

5.2.5 Nitrógeno amoniacal (N-NH₃)

La concentración de N-NH₃ en los filtros se muestra en la Figura 19, así como la comparación con el influente. Se observa como el N-NH₃ en el influente aumentó conforme aumentó la COV hasta llegar a un máximo de 232 mg·L⁻¹. Los valores de N-NH₃ en el efluente de los filtros se mantuvieron variado ligeramente, siendo a partir del día 20 menores a la concentración en el influente, indicando una remoción u oxidación del N-NH₃. Este fenómeno es común en los procesos anaerobios, y se conoce como anammox (oxidación anaerobia del ion amonio (NH₄⁺), por su acrónimo en inglés), en donde bacterias anaerobias oxidan los iones nitrito y amonio y los convierten en nitrógeno gas y nitratos, traduciéndose en una remoción de nitrógeno. Además, se sabe que el N-NH₃ cuando se encuentra en un medio ácido permanece disuelto en el agua como NH₄⁺ (López, 2008), lo cual respalda la teoría de que se llevó a cabo el proceso anammox. La energía que se obtiene de esta reacción se utiliza para la fijación de CO₂ que permite el crecimiento de nuevas células. Al mismo tiempo, de acuerdo con la estequiometría de la reacción, se produce un consumo de protones que provoca un aumento de pH debido a la actividad microbiana anammox (López, 2008). Esta podría ser una explicación del constante incremento del pH en el F1 y F3 durante la etapa de estabilización.

Los filtros reportaron valores máximos de 92 (F1), 116 (F2) y 111 (F3) mg·L⁻¹, lo cual no representó una amenaza para el funcionamiento de los sistemas. CONAGUA, (2015) reportó que solo valores superiores a 1,500 mg·L⁻¹ pueden ser tóxicos e inhibitorios para los procesos anaerobios.

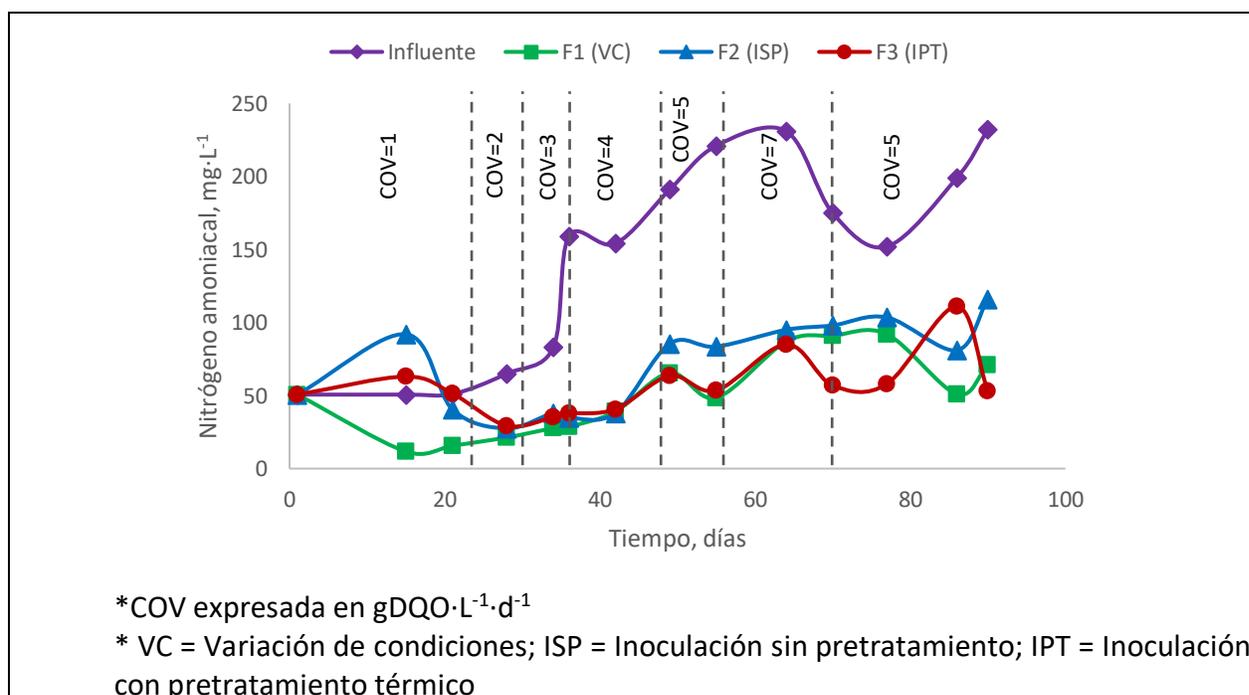


Figura 19. Nitrógeno amoniacal en el influente y efluente de los filtros en la etapa de estabilización

5.3 Operación y monitoreo de los filtros durante la etapa de las pruebas experimentales

A continuación, se presenta el comportamiento de los parámetros monitoreados en los tres filtros durante la etapa experimental, la cual duró 80 días y fue dividida en dos fases de 40 días cada una, en donde se evaluó el TRH teórico (10 y 5 h). Durante ambas fases la COV se mantuvo en $14.5 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

5.3.1 pH monitoreo en continuo

La Figura 20 muestra el comportamiento del pH en los sistemas durante las dos fases experimentales. Se observó un comportamiento estable, especialmente con el TRH de 5 h. En general, los valores registrados en los tres filtros se mantuvieron entre 4.5 y 6.5 unidades, permaneciendo dentro del rango adecuado reportado en la literatura (Bittencourt *et al.*, 2014; Arreola-Vargas *et al.*, 2013; Espinoza-Escalante *et al.*, 2009). El F2 fue el que presentó mayor estabilidad en toda la etapa, posiblemente debido a que su biomasa no recibió ningún pretratamiento y a que desde su inicio fue alimentado con vinaza a pH bajo (4 unidades), por lo cual no hubo grandes variaciones en sus condiciones. El F3 fue el que presentó valores de pH mayores a los demás filtros, evidenciándose notoriamente en la Figura 22. Esto se atribuyó principalmente a la composición de biogás de este filtro (apartado 5.3.7), pues tuvo el mayor contenido de metano, lo cual demuestra que algunas rutas metabólicas de la metanogénesis se llevaron a cabo, razón que explica el aumento de la alcalinidad por carbonatos (apartado 5.3.11) y, por ende, el aumento en el pH. A pesar de esto, F3 también se mantuvo dentro del rango aceptable para la fermentación oscura.

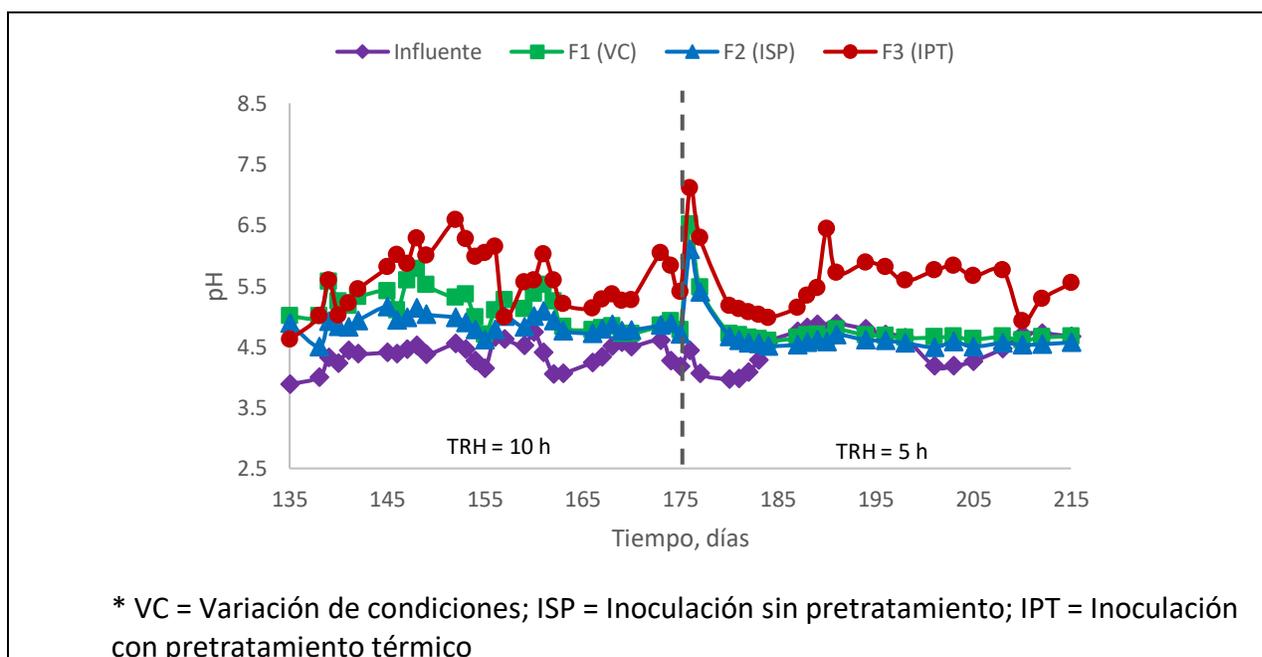


Figura 20. Comportamiento del pH en los filtros durante la etapa experimental en continuo

5.3.2 ORP

En la Figura 21 se muestra el comportamiento del ORP en los sistemas durante la etapa experimental. Se observan valores negativos, indicadores de un estado de reducción (anaerobiosis) presente. Asimismo, se observan valores dentro del rango de -130 a -300 mV, el cual es el óptimo en la etapa de acidogénesis para la producción de hidrógeno, siendo el F3 el que presentó los mejores valores, debido probablemente a que fue el reactor que se le dio pretratamiento térmico, propiciando el crecimiento de las bacterias productoras de hidrógeno (Vongvichiankul *et al.*, 2017).

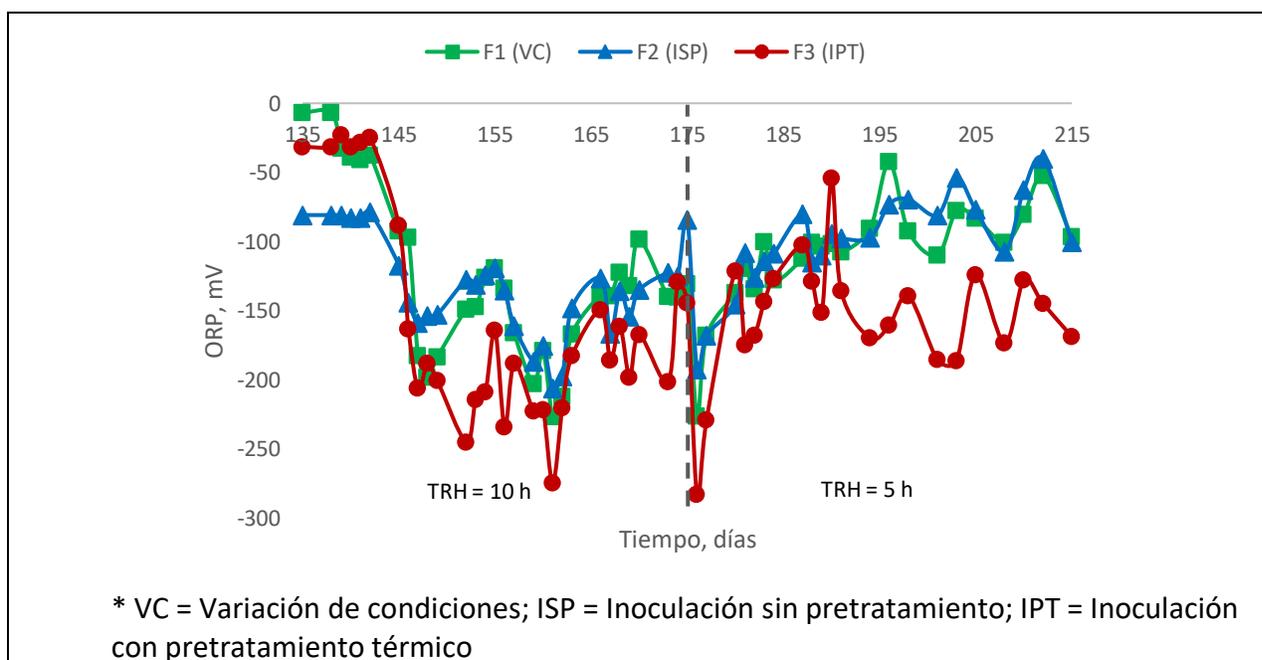


Figura 21. Comportamiento del ORP en los filtros durante la etapa experimental en continuo

5.3.3 Oxígeno disuelto (OD)

El oxígeno disuelto es muy importante en los procesos anaerobios, ya que, al encontrarse concentraciones muy altas dentro de los sistemas, es posible que exista una inhibición de las bacterias anaerobias. El valor adecuado de este parámetro es cercano a $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, sin embargo, la entrada de bajas concentraciones de oxígeno ($<1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) acompañado a la alimentación (defectos de bombeo, cierres defectuosos, etc.) no representa en general problemas, ya que los microorganismos que comienzan la degradación orgánica son facultativos (Fernández-Polanco y Seghezzi, 2015). En la Figura 22 se puede apreciar que los valores de los reactores se mantuvieron entre 0.16 y $0.63 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, los cuales no representaron problemas para el proceso fermentativo que se llevó a cabo.

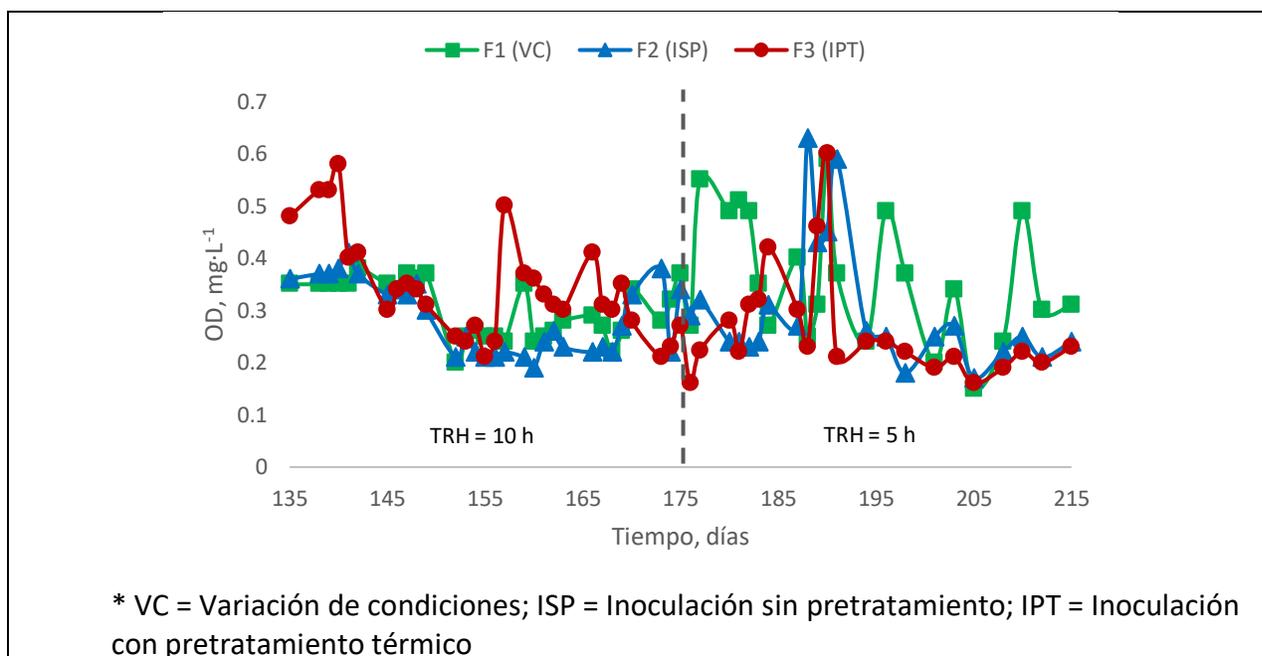


Figura 22. Comportamiento del OD en los filtros durante la etapa experimental en continuo

5.3.4 DQO monitoreo en continuo

La Figura 23 muestra la DQO tanto del influente como del efluente de los tres filtros durante la etapa de experimentación, en ella se puede apreciar que en toda la experimentación, la DQO en el efluente de F3 fue la que presentó valores más bajos, y F1 y F2 presentaron valores similares entre sí. Asimismo, con TRH de 10 h se observa gran diferencia entre los valores de DQO de los efluentes y los del influente, mientras que con TRH 5 h esa diferencia entre el influente y los efluentes se acortó, lo cual quiere decir que la remoción de DQO disminuyó. Esto se debe a que cuando el TRH disminuyó, las rutas metabólicas no tuvieron suficiente tiempo para realizarse completamente, es decir, no se terminó el ciclo; por lo tanto, no se llegó a los productos finales, por lo que se generaron metabolitos que quedaron libres sin reaccionar, lo cual se tradujo en una menor remoción de DQO. A pesar de que la DQO en el influente disminuyó con el TRH, la cantidad de materia orgánica disponible para los microorganismos fue la misma, pues tanto el TRH como la DQO se redujeron a la mitad, sin embargo, la COV se mantuvo constante. Esto posiblemente produciría un aumento en la producción volumétrica de biogás (apartado 5.3.7), ya que al aumentar la velocidad de dosificación del sustrato aumenta la tasa de reproducción de las bacterias, y, por ende, la tasa de producción de biogás.

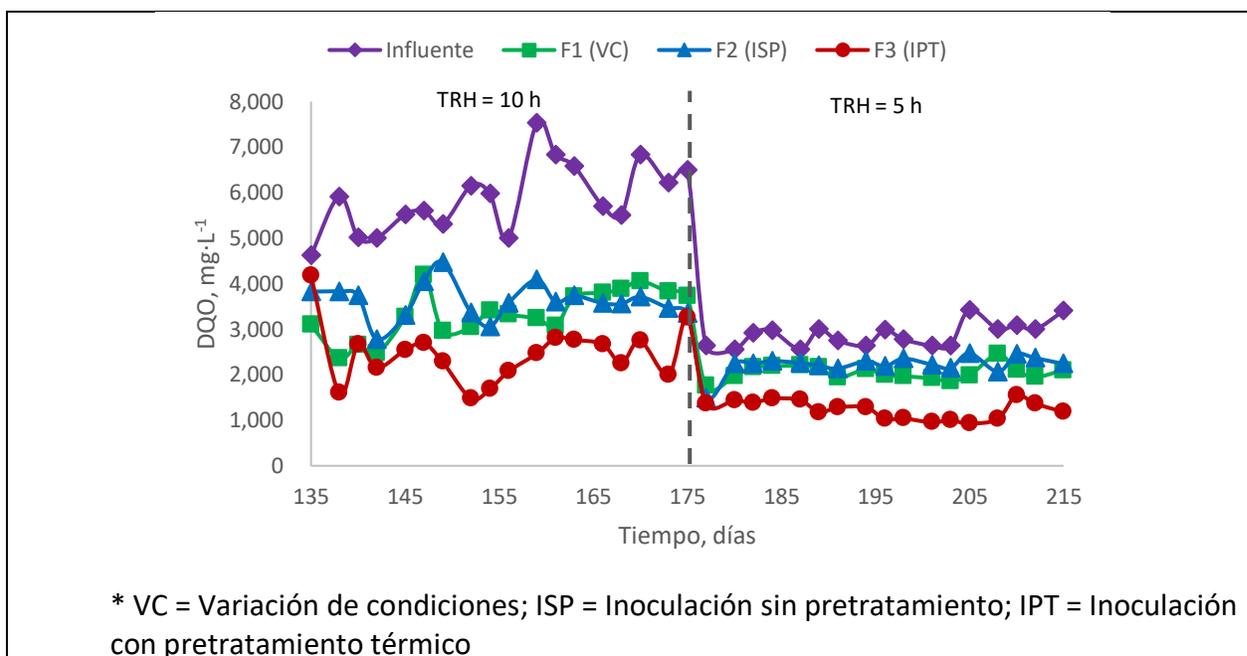


Figura 23. Comportamiento de la DQO durante la etapa de experimentación en continuo

En la Figura 24 se presentan las eficiencias de remoción de DQO en los filtros. El filtro que presentó los valores más altos durante toda la etapa experimental fue el F3, con un valor promedio de 57% (con ambos TRH) y valores máximos de hasta 76% (TRH 10 h) y 73% (TRH 5 h); mientras que el F1 y F2 presentaron valores muy similares entre sí, siendo F1 ligeramente mayor, con valores promedio de 43% (TRH 10 h) y 29% (TRH 5 h), y valores máximos de 60% y 42% para TRH 10 y 5 h, respectivamente. El F2 registró valores promedio de 38% (TRH 10 h) y 23% (TRH 5 h), y valores máximos de 49% (TRH 10 h) y 44% (TRH 5 h). La mayor estabilidad la presentó F3, manteniendo constante la remoción de DQO con ambos TRH, a diferencia de F1 y F2, donde la remoción disminuyó al variar el TRH a 5 h. Esto se debió posiblemente a que el pretratamiento térmico propició una mayor resistencia de las bacterias a los cambios en los parámetros ambientales y permitiendo que se mantuviera constante la remoción de DQO.

Nunes *et al.*, (2015) obtuvieron una remoción máxima de DQO del 37% en la producción de hidrógeno en un FAFA a partir de vinaza de caña de azúcar, siendo similar a la presente investigación, con la diferencia de que ellos emplearon un TRH de 24 h y una COV de 36 gDQO·L⁻¹·d⁻¹. Esta remoción de DQO reportada por ellos es menor a los obtenidos en la presente investigación con el F3 (en ambos TRH); y F1 y F2 (TRH 10 h), lo cual presenta un gran aporte por parte de esta investigación, demostrando que se pueden obtener remociones de DQO mayores a 50% en la fermentación oscura.

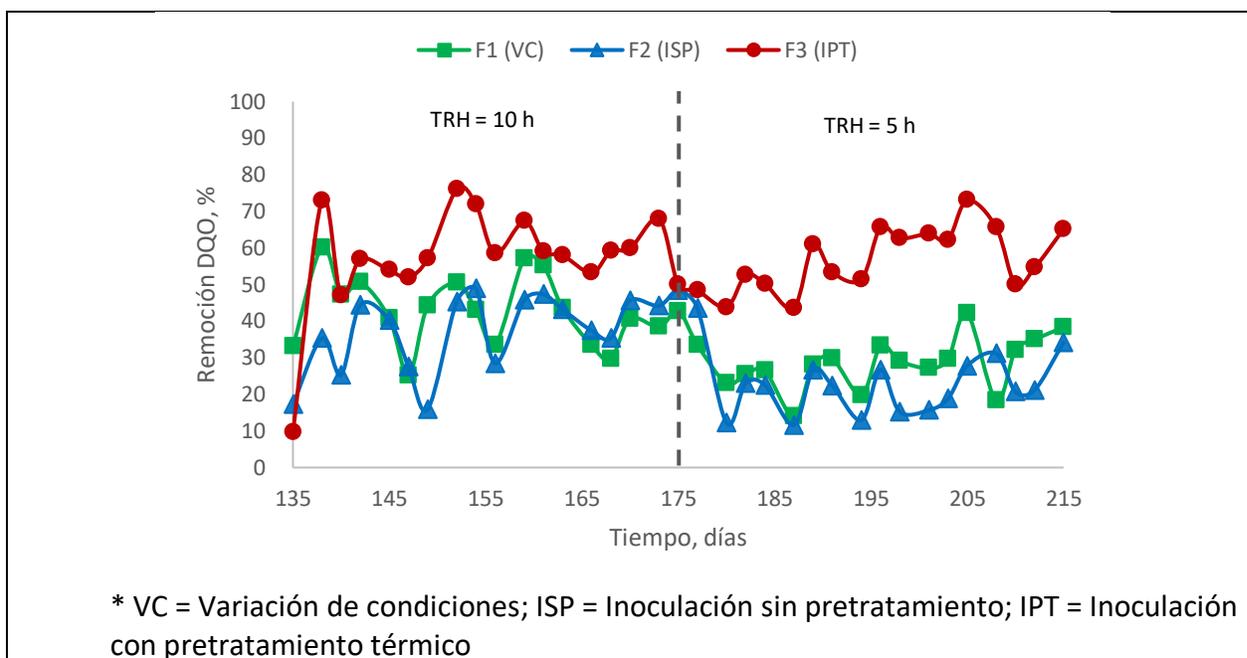


Figura 24. Eficiencia de remoción de DQO en los filtros durante la etapa de experimentación en continuo

5.3.5 Demanda Biológica de Oxígeno (DBO₅)

En la Figura 25a se muestra el comportamiento de la DBO₅ en el influente y en el efluente de los filtros durante la etapa de experimentación, de la cual cabe destacar que, de acuerdo a los valores registrados, la DBO₅ representa entre el 50 y 60% de la DQO, lo cual se debe a que la vinaza tequilera está compuesta en su mayoría por materia biodegradable proveniente de las piñas de agave. Asimismo, en la Figura 25b se presenta la eficiencia de remoción de DBO₅ en los filtros, donde puede apreciarse que la remoción de los filtros no varió considerablemente al cambiar el TRH, con excepción del F2, donde con TRH 5 h la remoción disminuyó, lo cual puede atribuirse a que al dar un pretratamiento a la biomasa (F3) o modificar las condiciones para propiciar la fermentación oscura (F1), además de propiciar una mayor producción de biogás rico en hidrógeno, es probable que también beneficie en la remoción de compuestos biodegradables, ya que los microorganismos pueden asimilar más fácilmente estos compuestos y convertirlos en hidrógeno. El F3 fue el filtro que presentó los valores más altos de remoción, con un máximo de 68% con ambos TRH. El F1 presentó máximos de 56 (TRH 10 h) y 50% (TRH 5 h), mientras que R2 presentó las remociones más bajas con valores máximos de 44 (TRH 10 h) y 26% (TRH 5 h).

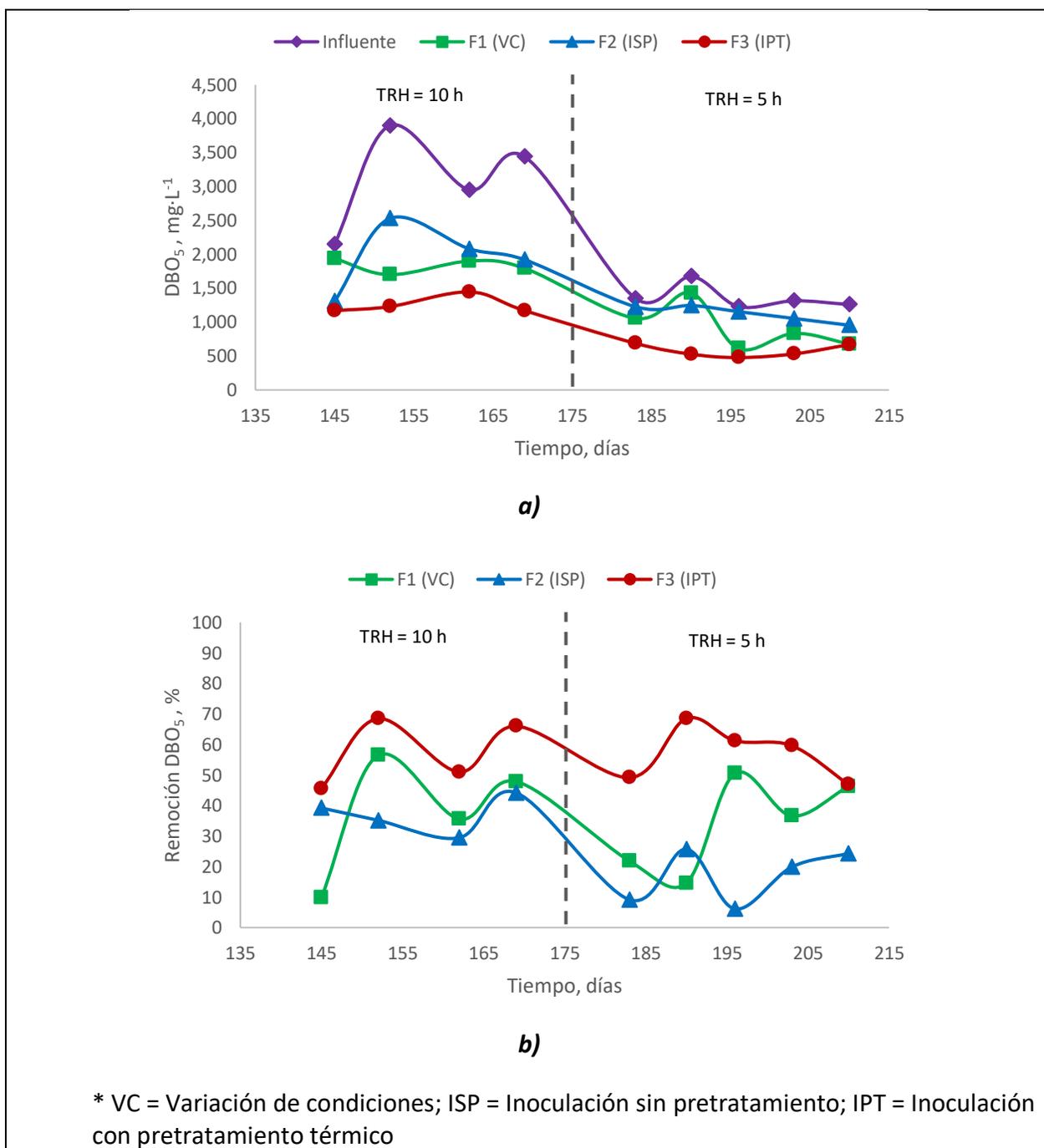
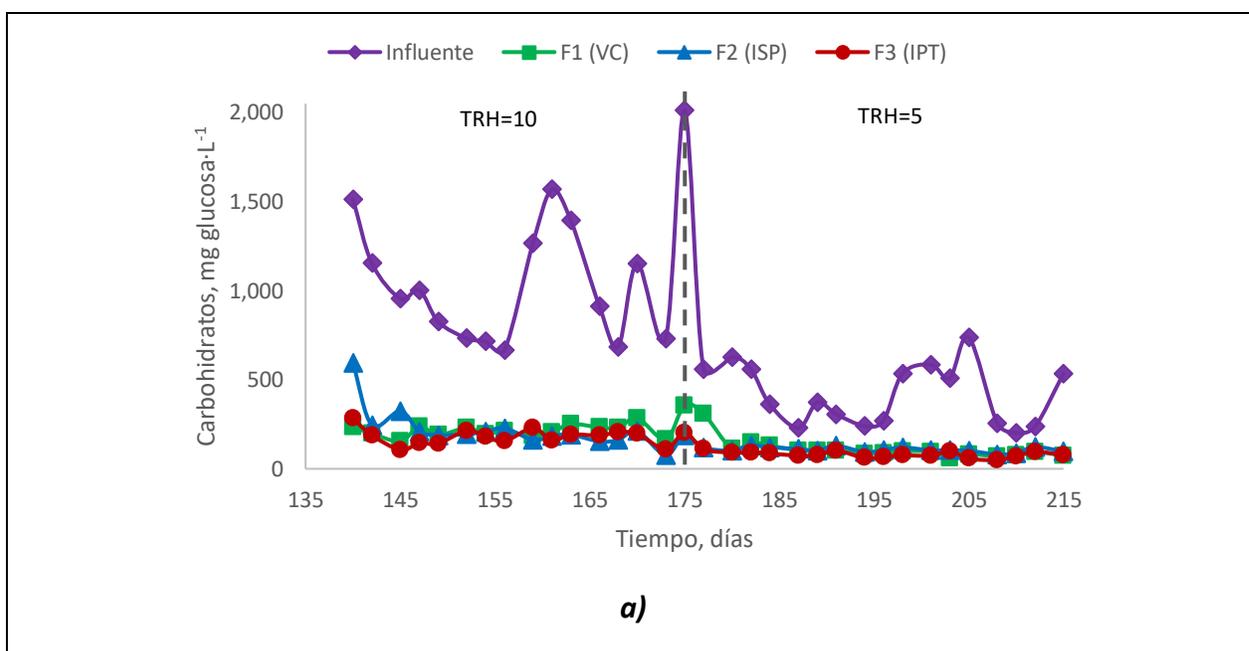


Figura 25. Comportamiento de la **a)** DBO₅ en el influente y efluente de los filtros; **b)** Remoción de DBO₅ en los filtros; durante la fase experimental

5.3.6 Carbohidratos

Los carbohidratos son un parámetro importante a determinar en la fermentación oscura, ya que estos son el sustrato principal en la etapa de acidogénesis debido a su estructura sencilla de asimilar para los microorganismos, por lo que la mayor parte del hidrógeno biológico es producido

a partir de estas macromoléculas en un orden de 2-4 moles de hidrógeno por mol de glucosa (Albarrán, 2017; Blanco, 2013), dependiendo la ruta metabólica que se lleve a cabo. La Figura 26a presenta el comportamiento de la concentración de carbohidratos, medidos como mg glucosa·L⁻¹, durante la fase experimental en los sistemas, mientras que la Figura 26b muestra el consumo de carbohidratos. Puede observarse que, tanto en la concentración como en el consumo de glucosa de los filtros, los valores entre si fueron bastante similares, presentando consumos máximos de 87, 90 y 91% (TRH 10 h); y 89, 86 y 92% (TRH 5 h); para F1, F2 y F3, respectivamente. Estos altos valores en el consumo demuestran que la mayor parte de los carbohidratos están siendo transformados por los microorganismos para la producción del biogás. El remanente podría corresponder a los carbohidratos pertenecientes a los compuestos no biodegradables como la celulosa, hemicelulosa, lignina, etc (Albarrán, 2017).



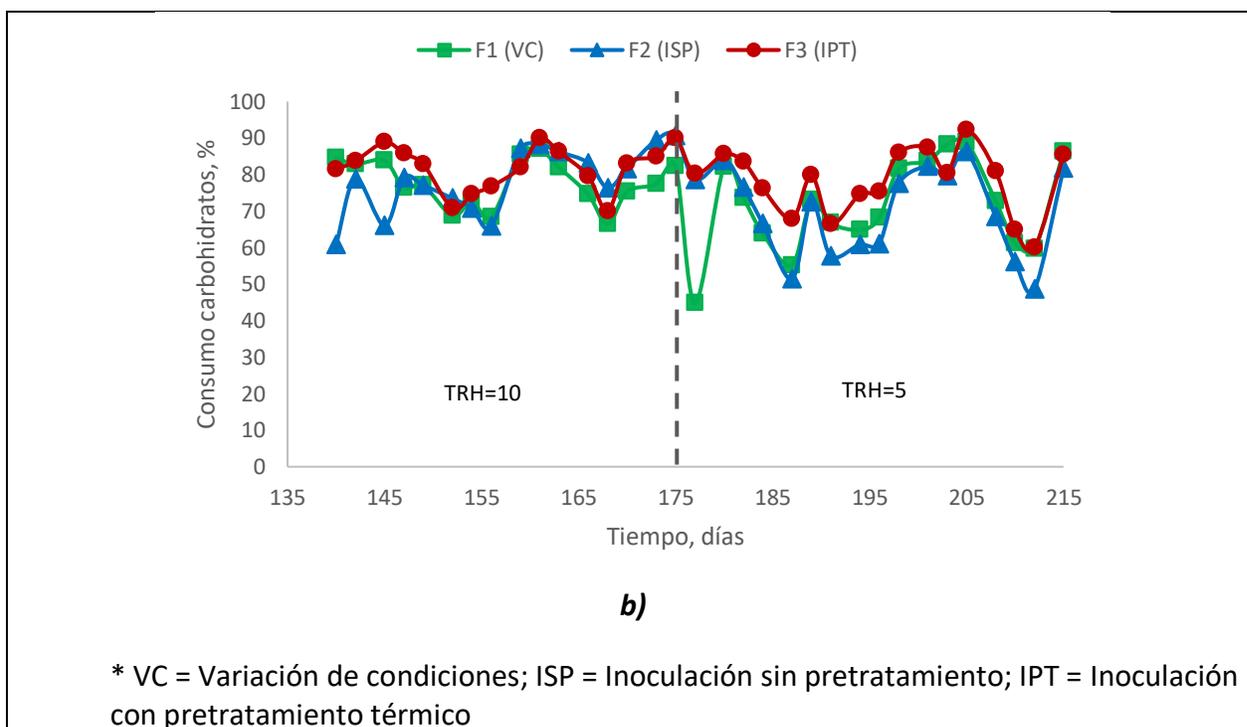


Figura 26. Comportamiento de la **a)** concentración de glucosa en el influente y efluente de los filtros; **b)** consumo de carbohidratos en los filtros; durante la fase experimental

5.3.7 Producción y composición del biogás en continuo

En la Figura 27 se muestra la producción de biogás en los tres filtros durante la fase experimental, haciéndose notorio que el F3 fue el filtro con la mayor producción en toda la etapa, elevando su producción respecto a los demás filtros con TRH 5 h, lo que demuestra que a menor TRH, aumenta la producción de biogás cuando se trabaja con biomasa pretratada térmicamente. Se observó que a pesar de que la remoción de DQO de F3 no aumentó con TRH 5 h, la producción de biogás sí aumentó en un 33% en comparación al TRH 10 h, lo cual puede explicarse al ver como la concentración de AGV (apartado 5.3.11) disminuyó con TRH 5 h, equilibrando el balance de materia, ya que parte de los AGV fueron convertidos en biogás. Sin embargo, deben analizarse los datos obtenidos de la composición de biogás para confirmar si el pretratamiento de la biomasa fue efectivo o no. Los valores promedio y máximos para el F3 fueron 4.8 y 5.3 $L \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ (TRH 10 h), respectivamente; y 7.2 y 8.8 $L \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ (TRH 5 h). Por otro lado, F1 y F2 presentaron valores muy similares entre sí. F1 obtuvo valores promedio de 3.5 (TRH 10 h) y 4.1 (TRH 5 h) $L \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$, y valores máximos de 4.6 (TRH 10) y 6.2 (TRH 5 h) $L \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$; mientras que R2 obtuvo valores promedio y máximos de 3.8 y 5.5 $L \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ (TRH 10 h), y 4.3 y 6.4 $L \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ (TRH 5 h), respectivamente. Estos valores son superiores a la mayoría de los reportados en la literatura y similares a los de Nunes *et al.*, (2015), Bittencourt *et al.*, (2014) y Buitrón y Carvajal, (2010), que registraron producciones de biogás de 4.6, 8 y 4.2 $L \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$, respectivamente, utilizando TRH de 24 y 12 h; y COV de 6-36 $gDQO \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$. Por otra parte, se mantienen por debajo de lo reportado por García-Depraect *et al.*, (2020) y Marques *et al.*, (2015), que promedian 13.5 y 40.2 $L \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ al operar con TRH de 6 y 1 h, respectivamente; COV de 169 y 120 $gDQO \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$; y cultivos bacterianos puros, atribuyendo a este

último factor la discrepancia en la producción de biogás en comparación a lo obtenido en la presente investigación.

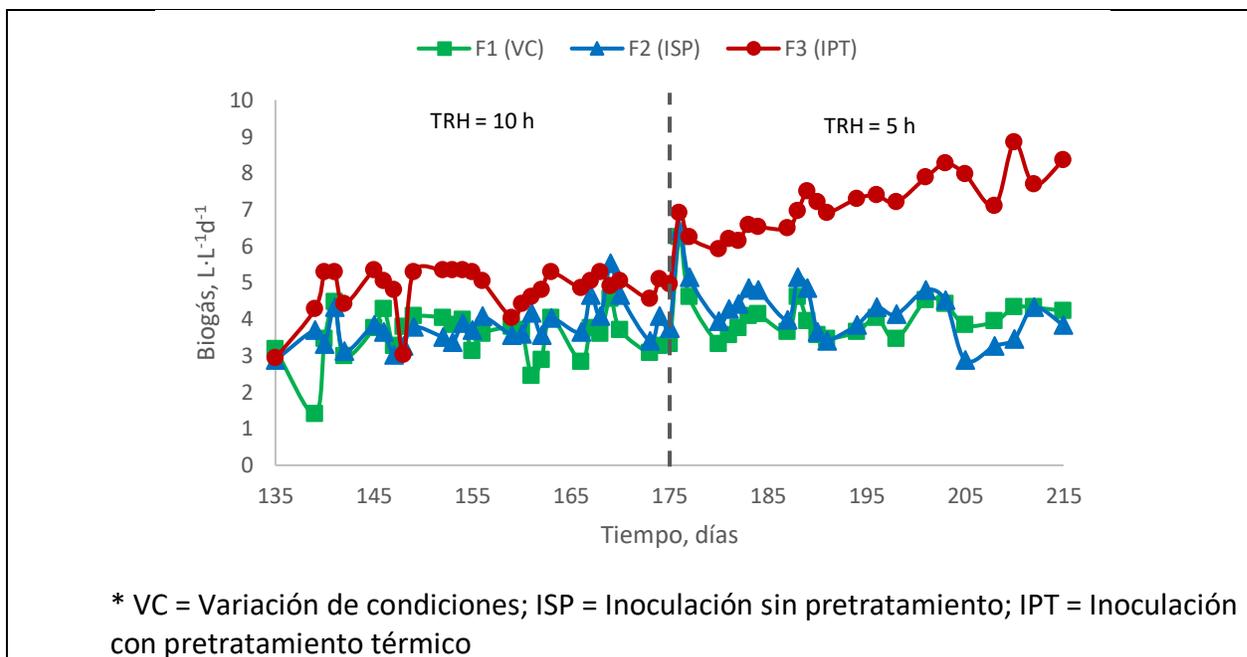
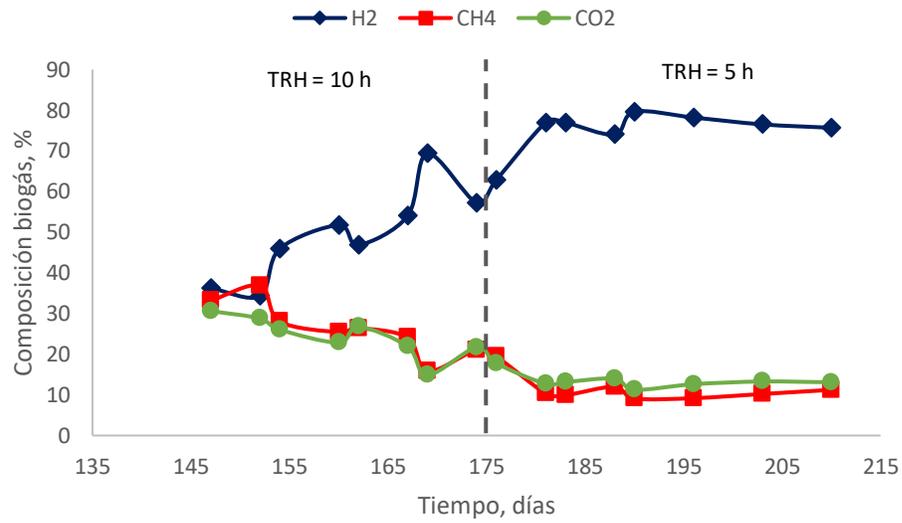
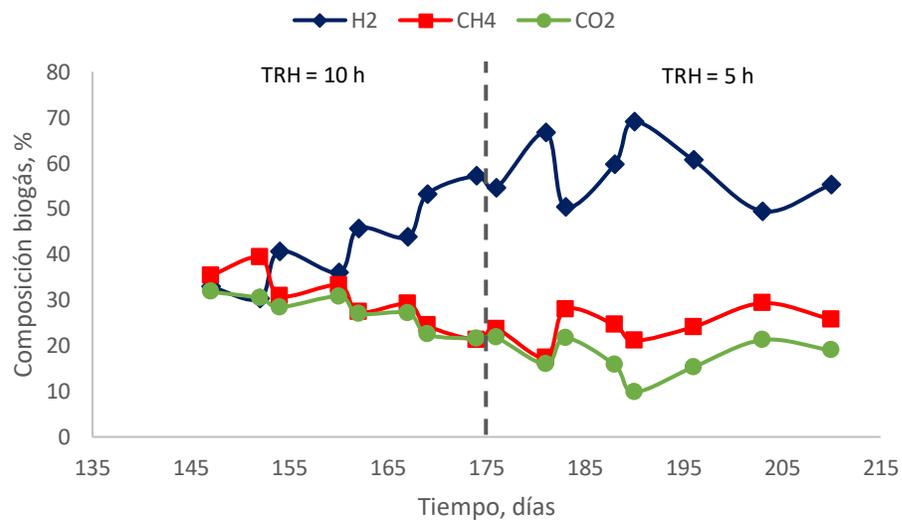


Figura 27. Producción de biogás de los filtros durante la etapa de experimentación en continuo

La Figura 28 muestra las determinaciones de la composición de biogás, por filtro, realizadas en cromatografía de gases durante la fase experimental. En general, se observa que en los tres filtros, a medida que avanzaron los días de operación, aumentó la concentración de hidrógeno y al mismo tiempo disminuyeron las concentraciones tanto de metano como de dióxido de carbono, siendo notorio que se obtuvieron mejores resultados con TRH 5 h. También se puede apreciar que el F3, a pesar de ser el filtro con pretratamiento térmico de la biomasa (el cuál se realizó para la inhibición de la actividad de las bacterias metanogénicas), fue el que presentó mayores concentraciones de metano en comparación a los otros filtros, lo que, en conjunto con los datos obtenidos de producción de biogás (dónde se observa un notable aumento con el cambio de TRH a 5 h), lleva a la conclusión de que el TRH adecuado para el F3 (tratamiento térmico) es de 5 h, ya que entre más corto es el TRH existe mayor seguridad de que no se completen las rutas metabólicas de la metanogénesis (Blanco, 2013). Como segunda premisa, se plantea la idea de que posiblemente el pretratamiento térmico no fue del todo eficiente, atribuyéndose a causas como un menor tiempo de calentamiento (21 h) en comparación a otras investigaciones (24 h) (Buitrón *et al.*, 2014; Buitrón y Carvajal, 2010; Albarrán, 2017). O bien, como última hipótesis, suponiendo que el pretratamiento térmico sí fue eficiente, probablemente las condiciones de pH presentes en la etapa de estabilización favorecieron la reproducción de las bacterias metanogénicas, y una vez que en la etapa de experimentación se alcanzó la estabilidad de pH, propició el aumento en la concentración de hidrógeno, aunque en una proporción menor a la de F1 y F2, como se puede apreciar en la Figura 29.



a)



b)

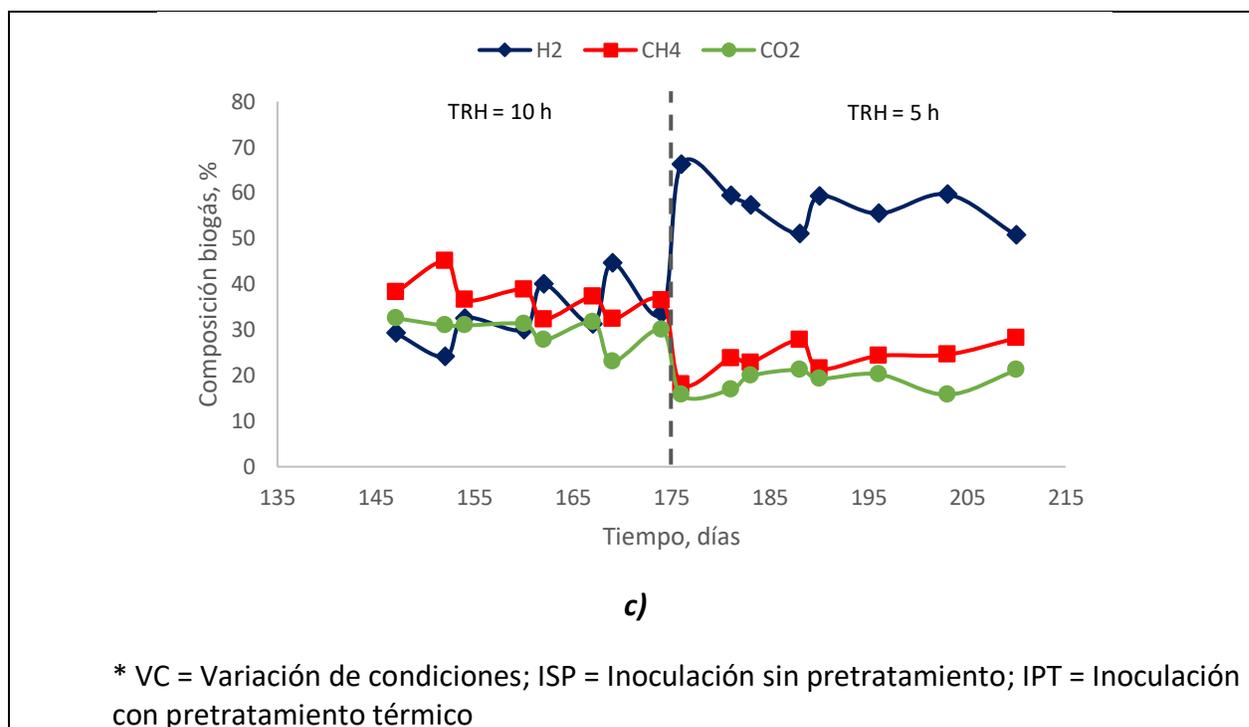


Figura 28. Composición del biogás producido durante la etapa experimental en continuo **a)** F1 (VC), **b)** F2 (ISP) y **c)** F3 (IPT)

En la Figura 29 se muestra el CHB en los filtros durante la etapa experimental. Los valores obtenidos en las mediciones fueron muy similares entre sí, siendo los de F1 ligeramente mayores a los demás. Asimismo, en los tres casos se observa que el CHB fue mayor con TRH 5 h. Con TRH 10 h los filtros presentaron valores promedio y máximos de 49 y 69% (F1), 42 y 57% (F2), y 33 y 45% (F3), respectivamente, mientras que con TRH 5 h registraron valores promedio y máximos de 75 y 80%, 58 y 69%, y 57 y 66%, respectivamente. Los valores máximos de los tres filtros obtenidos con TRH 5 h son mayores a los reportados por Buitrón *et al.*, (2014) (64%), quienes estudiaron la producción de hidrógeno en un FAFA a partir de vinaza tequilera, utilizando un TRH de 4 h y una COV de $51 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, demostrando que, aunque en la presente investigación se manejó una COV menor y un TRH ligeramente mayor, los resultados obtenidos en cuanto al CHB muestran una alta eficiencia del proceso. Asimismo, el valor máximo obtenido (69%) con TRH 10 h en F1 rebasa lo reportado en gran parte de la literatura, mostrando que es posible obtener un alto CHB, incluso mayor al obtenido con pretratamiento térmico, al variar las condiciones de digestión anaerobia a fermentación oscura en un FAFA, únicamente disminuyendo el pH en el sustrato influente; abriendo una gran brecha de oportunidad para innovación de las plantas generadoras de metano. En una investigación reciente de García-Depraect *et al.*, (2020), trabajando con un CSTR en la producción de hidrógeno a partir de vinaza tequilera, a TRH de 6 h y COV de $169 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, obtuvieron un contenido de hidrógeno del 91%, el cual representa el valor máximo registrado en la literatura. Los valores obtenidos en el presente estudio, operando con TRH similar (5 h) pero diferente COV ($14.5 \text{ gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), en un FAFA; aún están por debajo de dicho estudio.

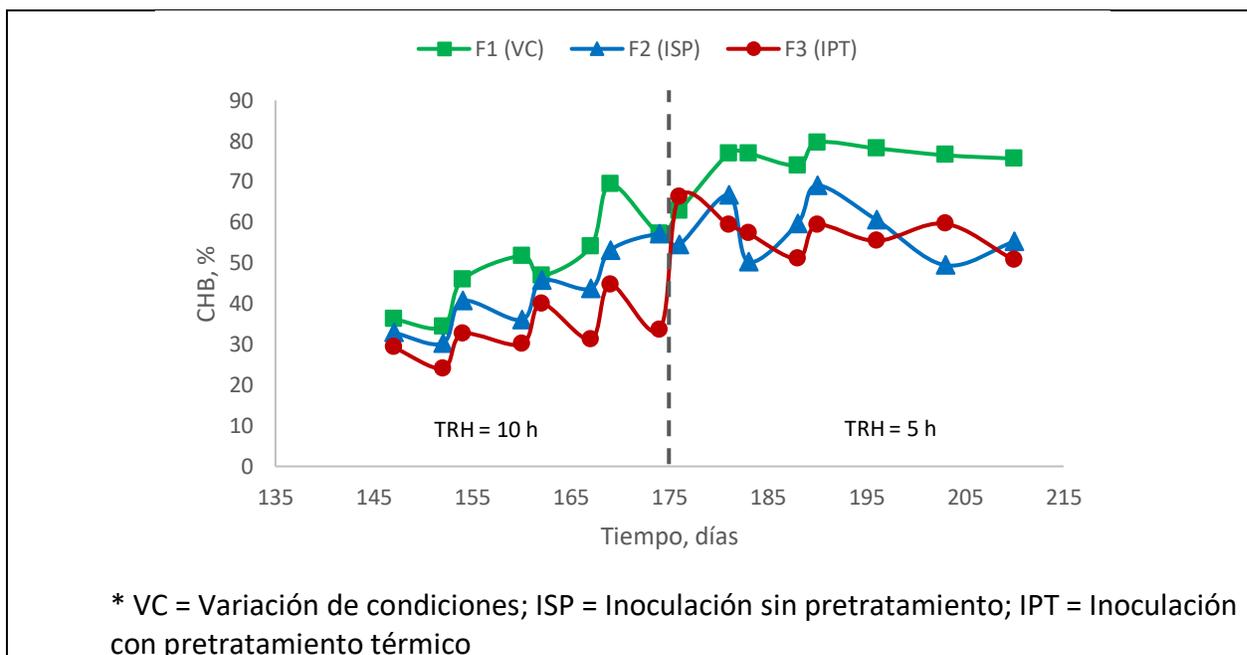


Figura 29. CHB en los filtros durante la etapa experimental en continuo

5.3.8 Tasa de producción de hidrógeno (TPH) y rendimiento de hidrógeno (RH)

A continuación se muestra la TPH (Figura 30a) registrada por los filtros en la etapa de experimentación en continuo, así como el RH (Figura 30b). Se obtuvieron valores mayores con TRH 5 h que con 10 h, en los tres filtros, para los dos parámetros. Con TRH 10 h, los valores promedio de RH registrados fueron 541 (F1), 473 (F2) y 318 (F3) NmL H₂·gDQO_{removida}⁻¹; con máximos de 887, 749 y 383 NmL H₂·gDQO_{removida}⁻¹, respectivamente. Mientras que con TRH 5 h se alcanzaron RH promedios de 1,364 (F1), 1,328 (F2) y 958 (F3) NmL H₂·gDQO_{removida}⁻¹; con máximos de 1,596, 1,611 y 1,291 NmL H₂·gDQO_{removida}⁻¹, respectivamente. Altos valores de RH indicaron que los filtros fueron capaces de aprovechar de mejor manera las moléculas de materia orgánica (DQO), produciendo una mayor cantidad de hidrógeno a partir de esta, es decir, hubo menor cantidad de pérdidas (Albarrán, 2017). Esto demostró que, en esta investigación, el pretratamiento térmico (F3) no mejoró el RH, pues se obtuvieron los valores menores respecto a los otros filtros. Por otra parte, aunque no hubo gran diferencia entre F1 y F2, se obtuvo un promedio mayor con F1, demostrando que la variación de condiciones de digestión anaerobia a fermentación oscura es una opción viable tanto para la producción de hidrógeno como para el tratamiento de la vinaza tequilera.

Los valores obtenidos de RH por los tres filtros con TRH 5 h en la presente investigación, sobrepasan por el doble a los máximos reportados en la literatura por Marques *et al.*, (2015) y García-Depraect *et al.*, (2020); donde utilizaron un reactor de lecho fluidizado y de agitación continua, trabajaron con vinaza tequilera y de caña de azúcar, emplearon cultivos bacterianos puros, TRH de 1 y 6 h, y COV 120 y 169 gDQO·L⁻¹·d⁻¹, obteniendo valores de RH de 517 y 541 mL

$\text{H}_2 \cdot \text{gDQO}_{\text{removida}}^{-1}$, respectivamente, tomando en cuenta que aunque su TRH fue similar al de la presente investigación, su COV fue más de 8 veces mayor. Esto demuestra que con cultivos bacterianos mixtos es posible obtener altos RH, sin necesidad de utilizar un cultivo puro, el cuál demanda mayor tiempo y dinero debido a los análisis y pruebas microbiológicas para el aislamiento de las bacterias, detección, purificación, codificación, etc.

Por otro lado, respecto a la TPH con TRH 10 h, se reportaron valores promedio de 2.3 (F1), 2.2 (F2) y 2.1 (F3) $\text{NL H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; y máximos de 4, 3.7 y 2.8 $\text{NL H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente. Para TRH 5 h se alcanzaron promedios de TPH de 4.1 (F1), 3.3 (F2) y 5.3 (F3) $\text{NL H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; con máximos de 5, 4.4 y 6.2 $\text{NL H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente. Los mejores valores se obtuvieron con F3 en TRH 5 h, lo que indicó que al menos en la TPH, el pretratamiento térmico tuvo un impacto positivo, concordando con lo reportado por Albarrán, (2017), Marques *et al.*, (2015) y Buitrón *et al.*, (2014). Este parámetro de respuesta podría ser considerado como el más importante, refiriéndose únicamente a la producción de hidrógeno en cantidad, ya que es un indicador del volumen de hidrógeno producido por unidad de volumen del reactor y por unidad de tiempo. Sin embargo, cuando se refiere al tratamiento de agua, adquiere la misma importancia tanto el RH como el CHB, ya que, aunque se tenga una alta TPH se puede tener un bajo RH y CHB. Los valores en conjunto de estos tres parámetros son los que llevarán a tomar la decisión de cuál método es el adecuado para elevar la producción de hidrógeno.

En cuanto a los valores promedio obtenidos de TPH con TRH 5 h en los tres filtros de esta investigación, son superiores por más del 15% a la mayoría de los resultados reportados por otros autores como Bittencourt *et al.*, (2014), Buitrón *et al.*, (2014), Buitrón y Carvajal, (2009) y Espinoza-Escalante *et al.*, (2009), que registran valores de 2.4, 1.7, 1.4 y 2.8 $\text{L H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente. En cambio, nuevamente García-Depraect *et al.*, (2020) y Marques *et al.*, (2015) registraron valores de 12.3 y 13.7 $\text{L H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ al operar con TRH de 6 y 1 h, y COV de 169 y 120 $\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente, además de emplear cultivos puros. Estos valores duplican a los máximos obtenidos en la presente investigación, sin embargo, es importante mencionar que en esta investigación se operó con TRH similar (5 h), con una COV más de 8 veces menor (14.5 $\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), y se empleó un cultivo bacteriano mixto.

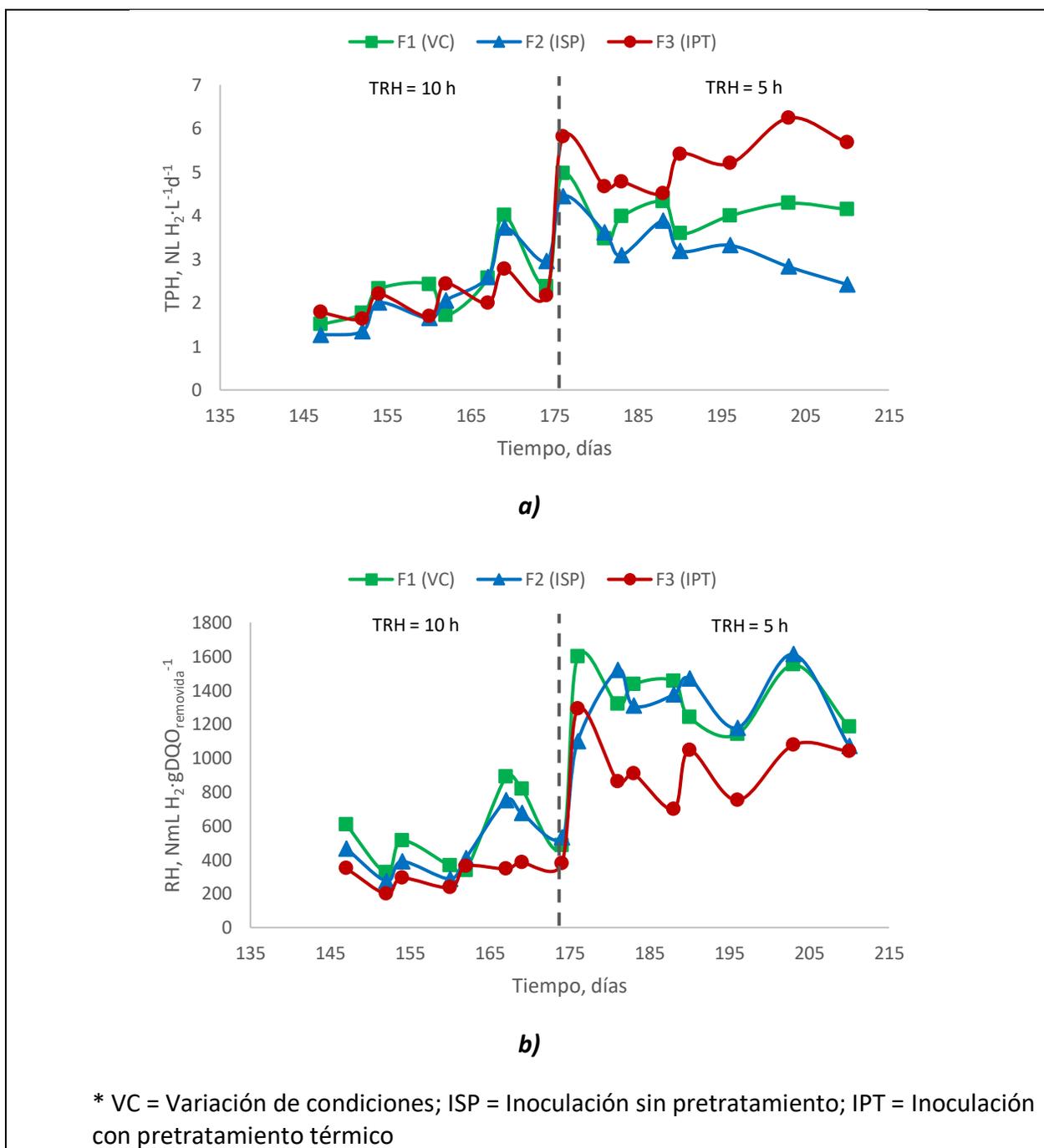


Figura 30. a) TPH registrada; **b)** RH registrado; en los filtros durante la etapa experimental en continuo

Al analizar los datos obtenidos de TPH y RH en la presente investigación y compararlos con los obtenidos por otros autores, se observó que las altas COV, TRH cortos y el uso de cultivos puros en conjunto, favorecen al incremento en la TPH considerablemente, mientras que únicamente

con TRH cortos, COV bajas y cultivos mixtos es posible alcanzar altos valores de RH, superando a los reportados en la literatura.

5.3.9 N-NH₃ monitoreo en continuo

La concentración de N-NH₃ en los filtros se muestra en la Figura 31. El N-NH₃ dentro de los filtros se mantuvo en valores similares entre sí durante toda la etapa experimental en continuo, siendo siempre menores a la concentración en el influente, indicando de nuevo que se llevó a cabo el proceso anammox, aunque en un menor grado en comparación a la etapa de estabilización. La concentración máxima de N-NH₃ medida en el influente fue de 95 mg·L⁻¹. Los valores determinados no representaron una amenaza para el funcionamiento de los sistemas, ya que Fernández-Polanco y Seghezzi, (2015) reportan que solo valores superiores a 1,500 mg·L⁻¹ pueden ser tóxicos e inhibitorios para los procesos anaerobios.

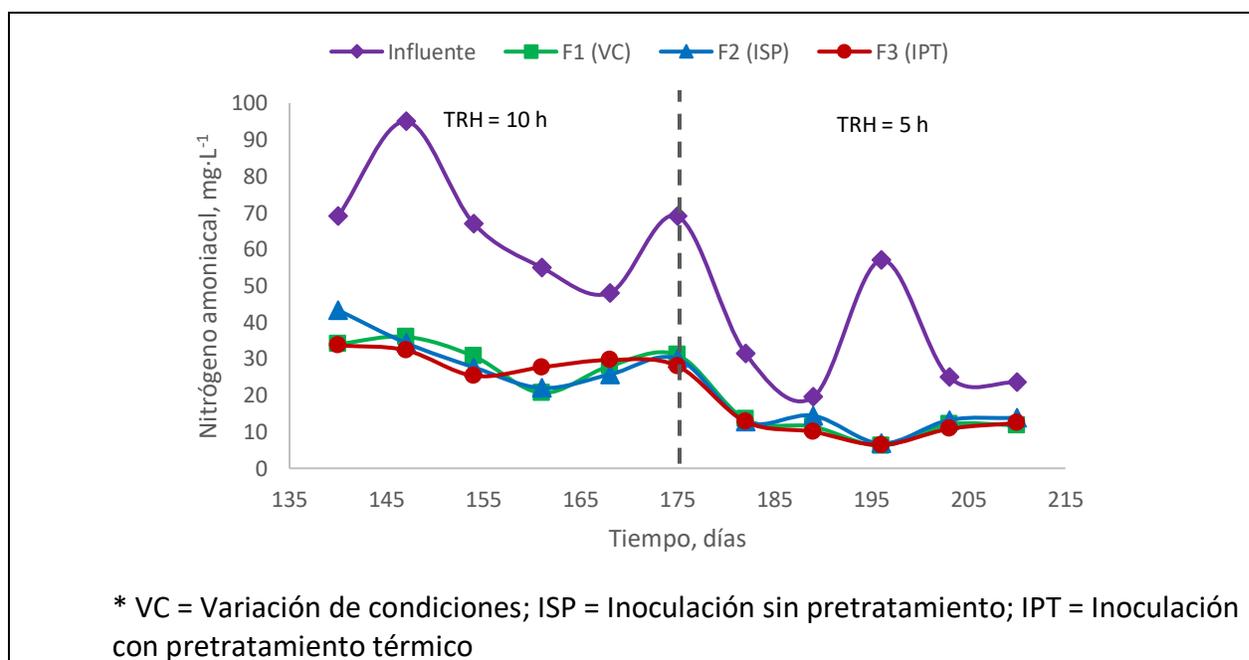


Figura 31. Nitrógeno amoniacal en el influente y efluente de los filtros en la etapa de experimentación

5.3.10 Sulfuros

En la Figura 32 se muestra la concentración de sulfuros presente en el influente y efluente de los filtros, la cual se mantuvo en constante fluctuación, presentando valores en los efluentes incluso por encima del influente (un máximo de 5.76 mg·L⁻¹), debido a la actividad de las bacterias sulfatoreductoras normalmente presentes en los procesos fermentativos, que reducen los sulfatos a sulfuros en ausencia de oxígeno (Fernández-Polanco y Seghezzi, 2015). No obstante, los valores máximos medidos en los sistemas no significaron un riesgo de toxicidad para el proceso anaerobio, ya que el límite máximo soportado, de acuerdo a Fernández-Polanco y Seghezzi, (2015), es 200 mg·L⁻¹.

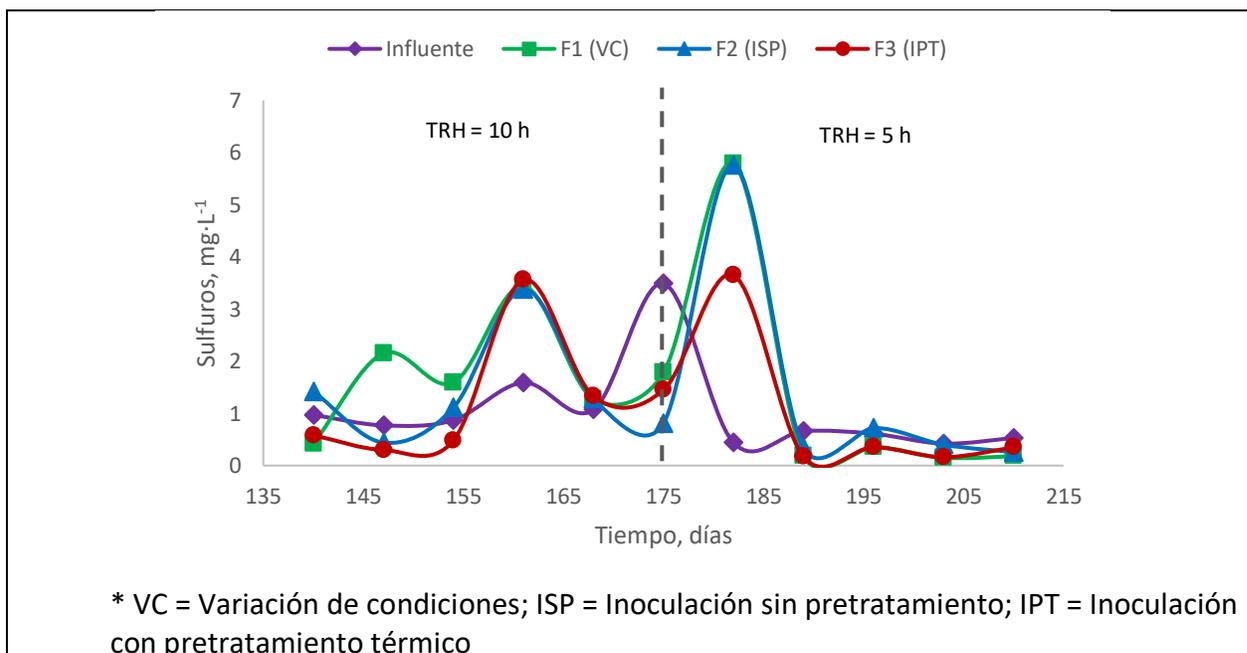


Figura 32. Sulfuros en el influente y efluente de los filtros durante la etapa experimental en continuo

5.3.11 Alcalinidad y AGV

En la Figura 33 se muestra la alcalinidad total determinada en los filtros. Los sistemas presentaron una notable variación con TRH 10 h, mientras que con TRH 5 h se observó una alta estabilidad. Los valores promedio de los sistemas con TRH 10 h fueron 398 (R1), 329 (R2) y 460 (R3) $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que con TRH 5 h fueron 137, 114 Y 248 $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Dichos valores indican una capacidad amortiguadora regular, ya que Fernández-Polanco y Seghezze, (2015) reportan valores mayores a $1,000 \text{ mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ como necesarios para una buena capacidad amortiguadora y entre $2,000$ y $5,000 \text{ mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ para un óptimo funcionamiento de la digestión anaerobia. Sin embargo, en el presente proyecto se llevó a cabo una fermentación oscura, en dónde la alcalinidad debe ser menor a $1,000 \text{ mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ para garantizar una ligera acidificación en el medio y pueda llevarse a cabo la acidogénesis. Por lo tanto, los valores de alcalinidad determinados en los sistemas durante la etapa experimental fueron aceptables para el proceso fermentativo que se llevó a cabo.

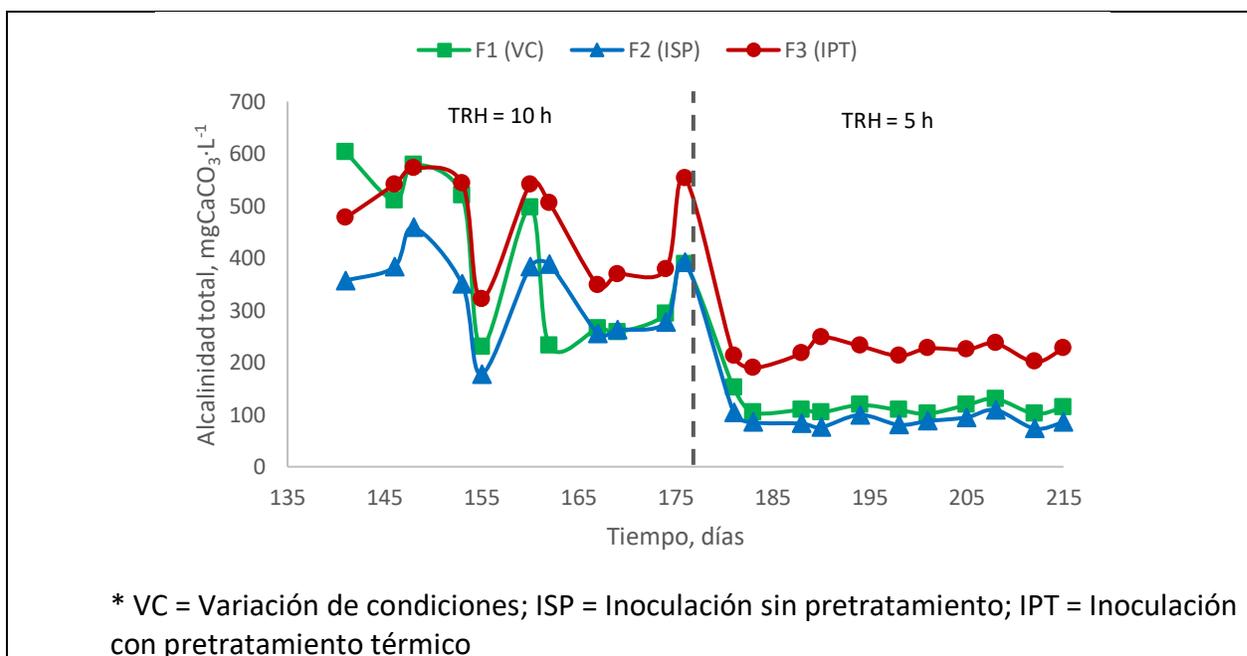


Figura 33. Alcalinidad total en el efluente de los filtros durante la etapa de experimentación

Los valores determinados de AGV se observan en la Figura 34a, donde se registraron promedios de 547 (R1), 466 (R2) y 562 (R3) mg·L⁻¹ para TRH 10 h, mientras que con TRH 5 h se obtuvieron valores promedio de 166 (R1), 145 (R2) y 276 (R3) mg·L⁻¹. Los valores con TRH 10 h fueron adecuados para la fermentación oscura, debido a que la literatura reporta valores alrededor de 500 mg·L⁻¹ como necesarios para un buen funcionamiento de la fermentación (Fernández-Polanco y Seghezzo, 2015). Por otro lado, los valores registrados con TRH 5 h muestran una alta estabilidad, manteniéndose en un rango muy estrecho sin un alto margen de variabilidad. Asimismo, se observa que cuando se reduce el TRH de 10 a 5 h, los AGV disminuyen, lo cual puede ser explicado con el CHB (apartado 5.3.7), pues su comportamiento fue inversamente proporcional. Esto se debe a que con TRH de 5 h la mayor parte de los AGV fueron transformados por los microorganismos en hidrógeno, por lo cual, los AGV disminuyeron mientras que el CHB aumentó (Figura 34b).

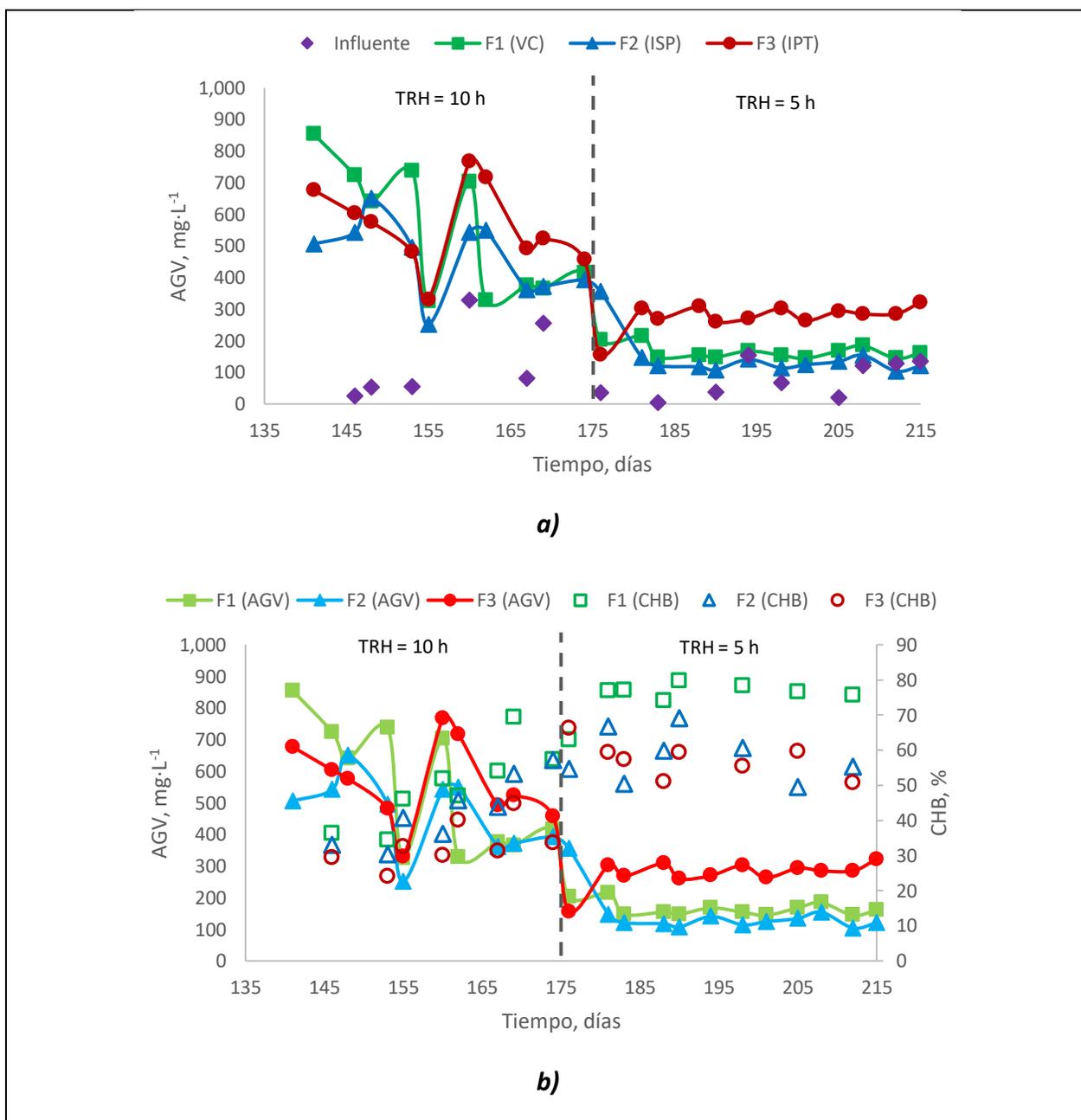


Figura 34. a) AGV en el influente y efluente de los filtros en la etapa experimental; **b)** comparación de AGV vs CHB

En la Tabla 9 se presenta un resumen con los valores promedio y su desviación estándar de los parámetros monitoreados más importantes durante la etapa de experimentación, así como de los parámetros de respuesta (CHB, TPH y RH).

Tabla 9. Resumen de los parámetros monitoreados y de respuesta durante la etapa de experimentación.

PARÁMETRO	TRH 10 h			TRH 5 h		
	F1 (VC)	F2 (ISP)	F3 (IPT)	F1 (VC)	F2 (ISP)	F3 (IPT)
	P+D.E.	P+D.E.	P+D.E.	P+D.E.	P+D.E.	P+D.E.
pH	5.2±0.3	4.9±0.1	5.6±0.4	4.8±0.2	4.7±0.2	5.6±0.4
Remoción DQO (%)	43±10	38±10	57±8	29±7	23±8	57±9
Remoción DBO ₅ (%)	37±20	37±6	58±11	34±15	17±9	57±9
Consumo carbohidratos (%)	78±7	78±9	82±6	71±13	70±12	78±9
Biogás (L·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	3.5±0.7	3.8±0.6	4.8±0.6	4.1±0.6	4.3±0.8	7.2±0.8
CHB (%)	49±11	42±9	33±6	75±5	58±7	57±5
TPH (NL H ₂ ·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	2.3±0.8	2.2±0.8	2.1±0.4	4.1±0.5	3.3±0.6	5.3±0.6
RH (NmL H ₂ ·gDQO _{removida} ⁻¹)	541±216	473±171	318±69	1,364±170	1,328±200	958±193

* VC = Variación de condiciones; ISP = Inoculación sin pretratamiento; IPT = Inoculación con pretratamiento térmico; P = Promedio; D.E. = Desviación Estándar

5.3.12 Análisis estadístico

El análisis estadístico realizado (ANEXO 1) para evaluar el efecto de las condiciones de arranque (F1, F2 y F3) y el TRH en el CHB, TPH y RH (parámetros de respuesta), demostró que sí existieron diferencias significativas en el TRH en todos los filtros, obteniendo mejores respuestas con TRH 5 h. Por otra parte, con TRH 5 h, se demostró que para el CHB existieron diferencias significativas entre todos los filtros, siendo mayor F1, mientras que para la TPH existió una diferencia significativa positiva entre F3 y los demás filtros. En cuanto al RH, se observó que con TRH 5 h existió una diferencia significativa negativa entre F3 y el resto de los reactores, sin mostrar diferencias significativas entre F1 y F2. Con TRH 10 h no hubo diferencias significativas entre los reactores para la TPH; al contrario del CHB y RH, donde existieron diferencias significativas únicamente entre F1 y F3 para los dos parámetros. En la Tabla 10 se presenta un resumen de los resultados de los análisis estadísticos realizados, donde en color verde se muestran las diferencias significativas, en color rojo las diferencias significativas negativas y en amarillo únicamente donde existen diferencias significativas.

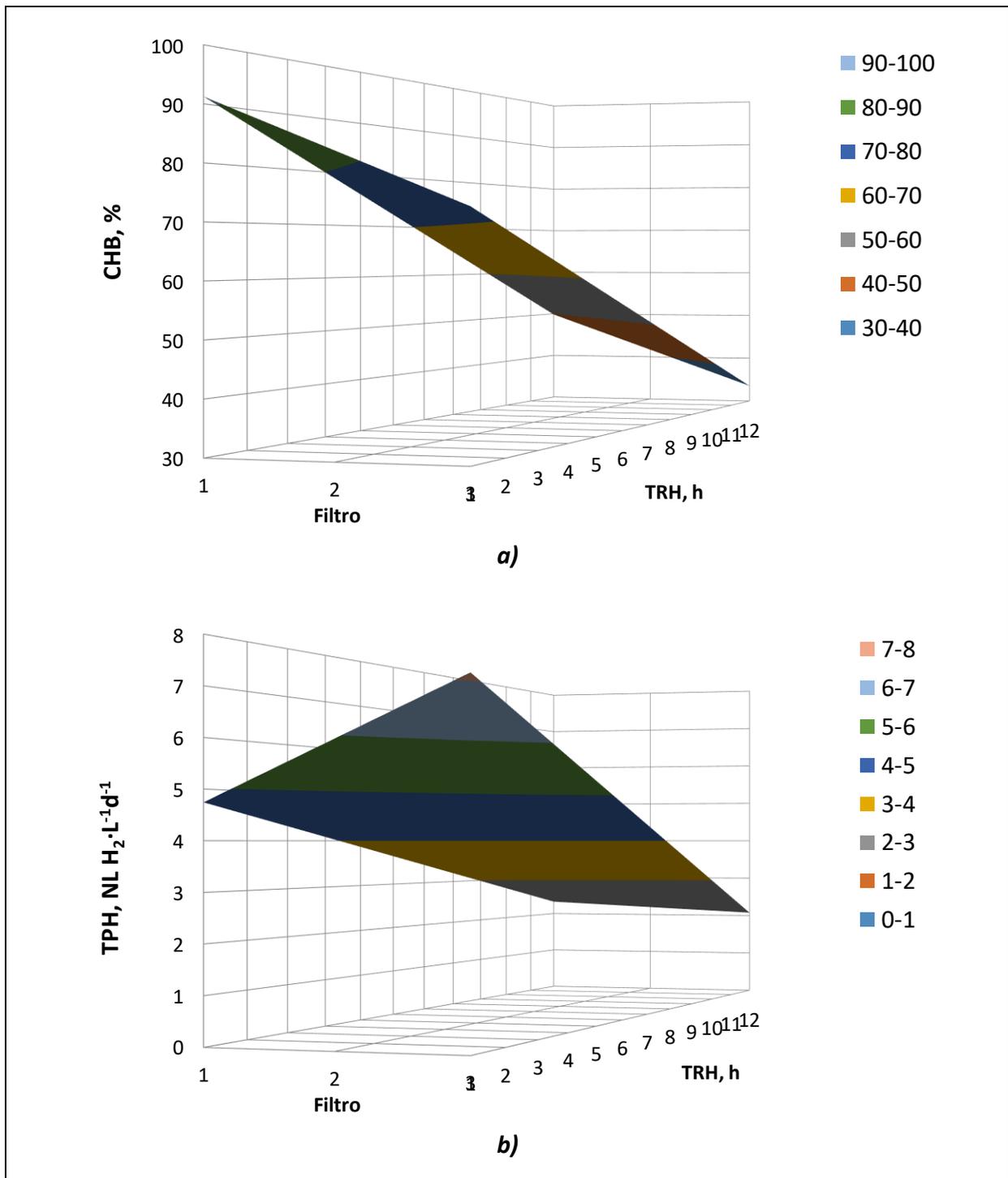
Tabla 10. Resumen de los análisis estadísticos

VARIABLE ANALIZADA	PARÁMETRO DE RESPUESTA	DIFERENCIA POBLACIONAL	SIGNIFICATIVA
F1 (VC)	CHB	TRH 10 – TRH 5	Sí
	TPH		
	RH		
F2 (ISP)	CHB		
	TPH		
	RH		
F3 (IPT)	CHB		
	TPH		
	RH		
TRH 5	CHB	F1 – F2	Sí
		F1 – F3	Sí
		F2 – F3	No
	TPH	F1 – F2	Sí
		F1 – F3	Sí
		F2 – F3	Sí
	RH	F1 – F2	No
		F1 – F3	Sí
		F2 – F3	Sí
TRH 10	CHB	F1 – F2	No
		F1 – F3	Sí
		F2 – F3	No
	TPH	F1 – F2	No
		F1 – F3	No
		F2 – F3	No
	RH	F1 – F2	No
		F1 – F3	Sí
		F2 – F3	No

* VC = Variación de condiciones; ISP = Inoculación sin pretratamiento; IPT = Inoculación con pretratamiento térmico

En la Figura 35 se presentan los análisis de regresión lineal múltiple realizados para cada parámetro de respuesta, donde se observó que entre menor sea el TRH, se obtendrán mejores valores en los parámetros de respuesta, con un valor óptimo de 1 h. Mientras que para las

condiciones de arranque se observó que con F3 (IPT) se maximiza la TPH, y con F1 (VC) se maximiza el RH y el CHB.



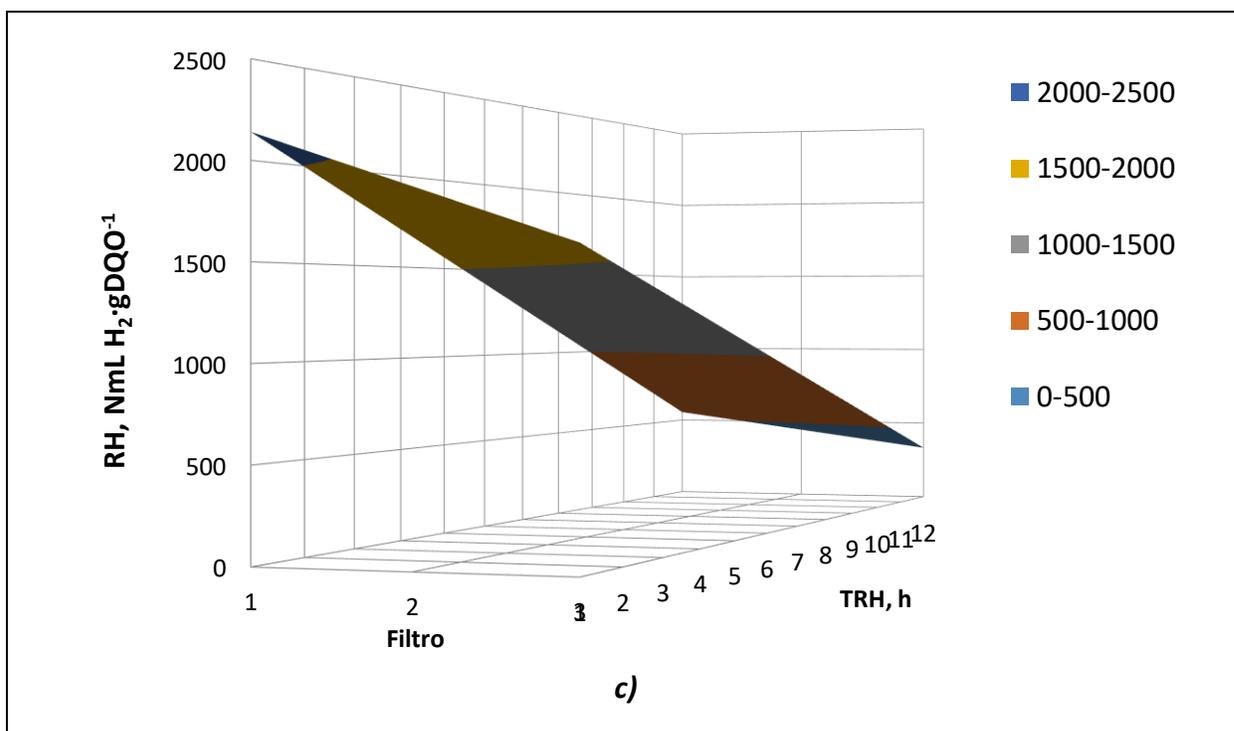


Figura 35. Análisis de regresión lineal múltiple para a) CHB, b) TPH y c) RH

5.3.13 Coeficientes cinéticos de degradación de materia orgánica

En la Figura 36 se muestran las cinéticas de degradación de materia orgánica en los filtros aplicando el modelo de Stover-Kincannon, donde se obtuvieron los mejores ajustes (R^2), comparado con otros modelos (ANEXO 3). Para TRH 5 h (Figura 36a), se obtuvieron parámetros cinéticos U_{max} de 1.7 (F1), 0.8 (F2) y $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$ (F3); y K_B de 17.9 (F1), 15.8 (F2) y $17.9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$ (F3). Con TRH 10 h (Figura 36b) se obtuvo U_{max} de 10 (F1), 1.7 (F2) y $1.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$ (F3); y K_B de 41.7 (F1), 16.3 (F2) y $14.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$ (F3). Esta gran variación entre los valores de U_{max} y K_B demuestran que los filtros aún no llegaron a su máxima capacidad de remoción de materia orgánica, siendo la constante de saturación (K_B) mayor a la constante de tasa máxima de remoción (U_{max}) por alrededor de 10 veces en todos los casos. Esto indicó que los filtros aún son capaces de soportar COV mayores y obtener buenos porcentajes de eficiencia de remoción de materia orgánica (Faekah, Fatihah y Samba, 2020). Sin embargo, a pesar de que con este modelo se obtuvieron los mejores valores de R^2 , no son lo suficientemente altos para explicar que el consumo de sustrato se encuentra en función de la COV, siendo solamente un 32-65% confiables. En la Tabla 11 se presenta un resumen de los coeficientes cinéticos obtenidos.

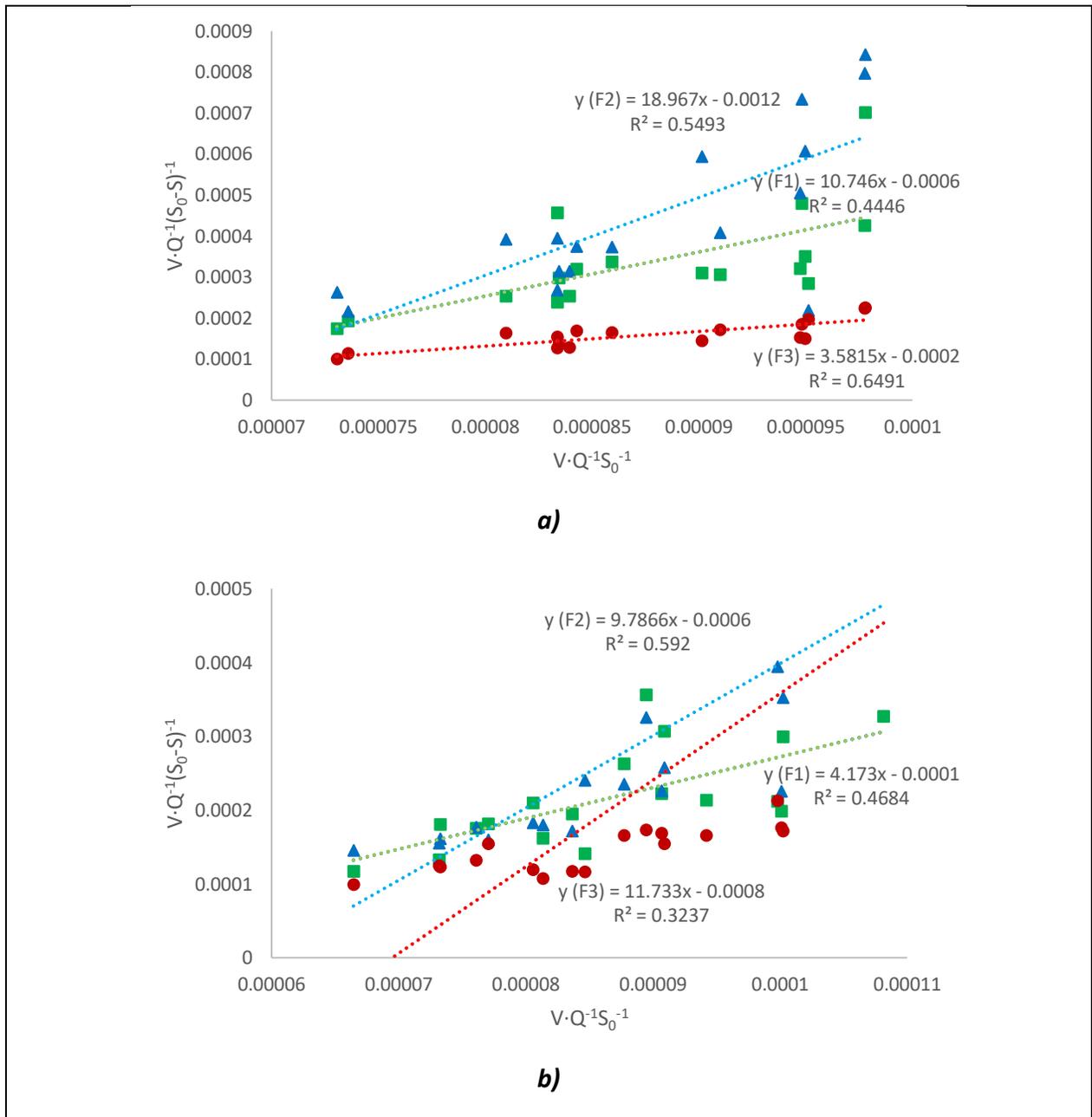


Figura 36. Cinéticas de degradación de materia orgánica en los filtros para TRH de a) 5 h; y b) 10 h

Tabla 11. Coeficientes cinéticos determinados

TRH (h)	FILTRO	U_{max} ($g \cdot L^{-1}d^{-1}$)	K_B ($g \cdot L^{-1}d^{-1}$)	R^2
5	F1 (VC)	1.67	17.91	0.445
	F2 (ISP)	0.83	15.81	0.549
	F3 (IPT)	5	17.91	0.649
10	F1 (VC)	10	41.73	0.468
	F2 (ISP)	1.67	16.31	0.592
	F3 (IPT)	1.25	14.67	0.324

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

Se logró evaluar el efecto de las condiciones de arranque en un FAFA en la producción de hidrógeno a partir de vinaza tequilera.

Se evaluaron diferentes condiciones de arranque en los FAFA para la remoción de materia orgánica en régimen batch (etapa de estabilización), obteniendo remociones promedio de DQO de 65 (F1-VC), 47 (F2-ISP) y 68% (F3-IPT), siendo la condición de arranque de inoculación con pretratamiento térmico la mejor para la remoción de materia orgánica en la etapa de estabilización, atribuyéndose principalmente a una resistencia de asimilación al sustrato generada por las bacterias al recibir el pretratamiento térmico, que propició una mayor biodegradación de materia orgánica. Sin embargo, las condiciones que imperaron en el F3 fueron principalmente metanogénicas, puesto que el pH obtenido se mantuvo en un rango de valores entre 5.8 y 7.4 unidades. Una vez que el sistema cambió a continuo el F3 comenzó a operar en un rango de pH de 4.6-7.1 unidades.

Respecto a la etapa de experimentación en régimen continuo, el análisis estadístico demostró que la mejor condición de arranque para el CHB y RH fue VC (F1), obteniendo valores experimentales promedio de 75% y 1,364 NmL H₂·gDQO_{removida}⁻¹, respectivamente, mientras que para la TPH fue IPT (F3), registrando 5.3 NL H₂·L⁻¹·d⁻¹; todos los parámetros obtenidos con TRH de 5 h. Los filtros alcanzaron altas remociones de DQO comparadas con otros autores, reportando 43 (F1), 38 (F2) y 57% (F3) con TRH de 10 h; y 29 (F1), 23 (F2) y 57% (F3) con TRH de 5 h.

En cuanto al TRH, el análisis estadístico demostró que, con 5 h, mejoraron en comparación a 10 h el CHB en un 35 (F1), 28 (F2) y 42% (F3); la TPH en un 44 (F1), 33 (F2) y 60% (F3); y el RH en un 60 (F1), 64 (F2) y 67% (F3).

Con el análisis de regresión lineal se logró obtener un valor óptimo de TRH de 1 h, el cuál elevó los tres parámetros de respuesta en un 18 (CHB), 25 (TPH) y 36% (RH), obteniendo mejores resultados con F1 (VC) para CHB y RH, y con F3 (IPT) para TPH.

Se aceptó la hipótesis planteada al obtener valores más altos de CHB y RH con la condición de arranque VC (F1), demostrando que la opción de producir hidrógeno a partir de vinaza tequilera en un FAFA en condiciones de digestión anaerobia es viable, únicamente disminuyendo el pH (de 7 a 4 unidades) en el influente para propiciar el desarrollo de condiciones de fermentación oscura.

Los resultados obtenidos en este proyecto representan una vía para la conversión de plantas productoras de metano a plantas productoras de hidrógeno sin necesidad de dejar de operar. Este cambio podría representar beneficios energéticos, económicos y ambientales para la industria tequilera.

CAPÍTULO 7. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con la investigación antes de ser aplicado a escala real, para evaluar la COV en niveles más altos que el utilizado en este estudio, y así, lograr la optimización de este proceso innovador. Además, se recomienda realizar la evaluación de los sistemas a largo plazo para verificar que la producción de hidrógeno se mantenga a través del tiempo.

Se propone determinar la concentración de proteínas y lípidos presentes en la vinaza tanto cruda como tratada, así como sus porcentajes de remoción. Con esto se obtendrá mayor información acerca de la dirección de las rutas metabólicas y qué es lo que se está produciendo específicamente. De igual manera, determinar la concentración de celulosa, hemicelulosa y lignina, para verificar si el remanente de la DBO₅ corresponde a estos compuestos.

ANEXO 2. Análisis estadístico

Evaluación de TRH (10 h = μ_1 ; 5 h = μ_2) $\alpha = 0.05$

CHB-F1

Tabla ANOVA						
Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	f (exp)	F tablas (0.05; 1; 14)	p-value
Tratamientos	1	2,630	2,630	34	5	0.0000
Error	14	1,097	78			
Total	15	3,727				
					SE RECHAZA H0	SE RECHAZA H0
Como $f > F$, se rechaza la hipótesis nula (H_0). Sí existe diferencia entre los TRH en el CHB						
Como $p\text{-value} < \alpha$, se rechaza H_0						
LSD						
Hipótesis	Diferencia poblacional	Diferencia muestral en valor absoluto	Valor LSD	Decisión		
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	$\mu_1 - \mu_2$	26	9	SIGNIFICATIVA		

CHB-F2

Tabla ANOVA						
Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	f (exp)	F tablas (0.05; 1; 14)	p-value
Tratamientos	1	993	993	14	5	0.0021
Error	14	985	70			
Total	15	1,979				
					SE RECHAZA H0	SE RECHAZA H0
Como $f > F$, se rechaza la hipótesis nula (H_0). Sí existe diferencia entre los TRH en el CHB						
Como $p\text{-value} < \alpha$, se rechaza H_0						
LSD						
Hipótesis	Diferencia poblacional	Diferencia muestral en valor absoluto	Valor LSD	Decisión		
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ vs $H_1: \mu_1 \neq$	$\mu_1 - \mu_2$	16	9	SIGNIFICATIVA		

CHB-F3

Tabla ANOVA						
Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	f (exp)	F tablas (0.05; 1; 14)	p-value
Tratamientos	1	2,348	2,348	70	5	0.0000
Error	14	471	34			
Total	15	2,819				
					SE RECHAZA H0	SE RECHAZA H0
Como $f > F$, se rechaza la hipótesis nula (H_0). Sí existe diferencia entre los TRH en el CHB						
Como $p\text{-value} < \alpha$, se rechaza H_0						
LSD						
Hipótesis	Diferencia poblacional	Diferencia muestral en valor absoluto	Valor LSD	Decisión		
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ vs $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	$\mu_1 - \mu_2$	24	6	SIGNIFICATIVA		

TPH-F1

Tabla ANOVA						
Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	f (exp)	F tablas (0.05; 1; 14)	p-value
Tratamientos	1	12	12	30	5	0.0001
Error	14	6	0.42			
Total	15	18				
					SE RECHAZA H0	SE RECHAZA H0
Como $f > F$, se rechaza la hipótesis nula (H_0). Sí existe diferencia entre los TRH en la TPH						
Como $p\text{-value} < \alpha$, se rechaza H_0						
LSD						
Hipótesis	Diferencia poblacional	Diferencia muestral en valor absoluto	Valor LSD	Decisión		
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ vs $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	$\mu_1 - \mu_2$	1.76	0.69	SIGNIFICATIVA		

TPH-F2

Tabla ANOVA						
Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	f (exp)	F tablas (0.05; 1; 14)	p-value
Tratamientos	1	5	5	10	5	0.0080
Error	14	8	0.56			
Total	15	13				
					SE RECHAZA H0	SE RECHAZA H0
Como $f > F$, se rechaza la hipótesis nula (H_0). Sí existe diferencia entre los TRH en la TPH						
Como $p\text{-value} < \alpha$, se rechaza H_0						
LSD						
Hipótesis	Diferencia poblacional	Diferencia muestral en valor absoluto	Valor LSD	Decisión		
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ vs $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	$\mu_1 - \mu_2$	1.15	0.80	SIGNIFICATIVA		

TPH-F3

Tabla ANOVA						
Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	f (exp)	F tablas (0.05; 1; 14)	p-value
Tratamientos	1	41	41	155	5	0.0000
Error	14	4	0.26			
Total	15	45				
					SE RECHAZA H0	SE RECHAZA H0
Como $f > F$, se rechaza la hipótesis nula (H_0). Sí existe diferencia entre los TRH en la TPH						
Como $p\text{-value} < \alpha$, se rechaza H_0						
LSD						
Hipótesis	Diferencia poblacional	Diferencia muestral en valor absoluto	Valor LSD	Decisión		
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ vs $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	$\mu_1 - \mu_2$	3.20	0.55	SIGNIFICATIVA		

“Efecto de las condiciones de arranque de filtros anaerobios de flujo ascendente en la producción de hidrógeno a partir de vinaza tequilera”

Anexos

RH-F1

Tabla ANOVA						
Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	f (exp)	F tablas (0.05; 1; 14)	p-value
Tratamientos	1	2,709,488	2,709,488	72	5	0.0000
Error	14	527,010	37,643.58			
Total	15	3,236,499				
					SE RECHAZA H0	SE RECHAZA H0
Como $f > F$, se rechaza la hipótesis nula (H_0). Sí existe diferencia entre los TRH en el RH						
Como $p\text{-value} < \alpha$, se rechaza H_0						
LSD						
Hipótesis	Diferencia poblacional	Diferencia muestral en valor absoluto	Valor LSD	Decisión		
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ vs $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	$\mu_1 - \mu_2$	823.03	208.07	SIGNIFICATIVA		

RH-F2

Tabla ANOVA						
Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	f (exp)	F tablas (0.05; 1; 14)	p-value
Tratamientos	1	2,928,077	2,928,077	84	5	0.0000
Error	14	486,071	34,719.37			
Total	15	3,414,148				
					SE RECHAZA H0	SE RECHAZA H0
Como $f > F$, se rechaza la hipótesis nula (H_0). Sí existe diferencia entre los TRH en el RH						
Como $p\text{-value} < \alpha$, se rechaza H_0						
LSD						
Hipótesis	Diferencia poblacional	Diferencia muestral en valor absoluto	Valor LSD	Decisión		
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ vs $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	$\mu_1 - \mu_2$	855.58	199.82	SIGNIFICATIVA		

RH-F3

Tabla ANOVA						
Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	f (exp)	F tablas (0.05; 1; 14)	p-value
Tratamientos	1	1,641,048	1,641,048	78	5	0.0000
Error	14	294,948	21,067.73			
Total	15	1,935,996				
					SE RECHAZA H0	SE RECHAZA H0
Como $f > F$, se rechaza la hipótesis nula (H_0). Sí existe diferencia entre los TRH en el RH						
Como $p\text{-value} < \alpha$, se rechaza H_0						
LSD						
Hipótesis	Diferencia poblacional	Diferencia muestral en valor absoluto	Valor LSD	Decisión		
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ vs $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	$\mu_1 - \mu_2$	640.52	155.65	SIGNIFICATIVA		

Evaluación de las condiciones de arranque ($F_1 = \mu_1$; $F_2 = \mu_2$; $F_3 = \mu_3$) $\alpha = 0.05$

CHB-10 h

Tabla ANOVA						
Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	f (exp)	F tablas (α ; glr; glE)	p-value
Tratamientos	2	1,068	534	6.15	3.47	0.0079
Error	21	1,823	86.83			
Total	23	2,892				
					SE RECHAZA H0	SE RECHAZA H0
Como $f > F$, se rechaza la hipótesis nula (H_0). Sí existen diferencias entre los filtros en el CHB						
Como $p\text{-value} < \alpha$, se rechaza H_0						
LSD						
Hipótesis	Diferencia poblacional	Diferencia muestral en valor absoluto	Valor LSD	Decisión		
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ vs $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	$\mu_1 - \mu_2$	6.99	9.69	NO SIGNIFICATIVA		
$H_0: \mu_1 = \mu_3$ vs $H_1: \mu_1 \neq \mu_3$	$\mu_1 - \mu_3$	16.29	9.69	SIGNIFICATIVA		
$H_0: \mu_2 = \mu_3$ vs $H_1: \mu_2 \neq \mu_3$	$\mu_2 - \mu_3$	9.29	9.69	NO SIGNIFICATIVA		

CHB-5 h

Tabla ANOVA						
Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	f (exp)	F tablas (α ; glr; gIE)	p-value
Tratamientos	2	1,597	798	22.98	3.47	0.0000
Error	21	729	34.74			
Total	23	2,326				
					SE RECHAZA H0	SE RECHAZA H0
Como $f > F$, se rechaza la hipótesis nula (H_0). Sí existen diferencias entre los filtros en el CHB						
Como $p\text{-value} < \alpha$, se rechaza H_0						
LSD						
Hipótesis	Diferencia poblacional	Diferencia muestral en valor absoluto	Valor LSD	Decisión		
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ vs $H_1: \mu_1 \neq$	$\mu_1 - \mu_2$	16.87	6.13	SIGNIFICATIVA		
$H_0: \mu_1 = \mu_3$ vs $H_1: \mu_1 \neq$	$\mu_1 - \mu_3$	17.70	6.13	SIGNIFICATIVA		
$H_0: \mu_2 = \mu_3$ vs $H_1: \mu_2 \neq$	$\mu_2 - \mu_3$	0.83	6.13	NO SIGNIFICATIVA		

TPH – 10 h

Tabla ANOVA						
Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	f (exp)	F tablas (α ; glr; glE)	p-value
Tratamientos	2	0	0	0.25	3.47	0.7793
Error	21	10	0.49			
Total	23	11				
					SE ACEPTA H0	SE ACEPTA H0
Como $f < F$, se acepta la hipótesis nula (H_0). No existen diferencias entre los filtros en la TPH						
Como $p\text{-value} > \alpha$, se acepta H_0						
LSD						
Hipótesis	Diferencia poblacional	Diferencia muestral en valor absoluto	Valor LSD	Decisión		
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ vs $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	$\mu_1 - \mu_2$	0.13	0.73	NO SIGNIFICATIVA		
$H_0: \mu_1 = \mu_3$ vs $H_1: \mu_1 \neq \mu_3$	$\mu_1 - \mu_3$	0.25	0.73	NO SIGNIFICATIVA		
$H_0: \mu_2 = \mu_3$ vs $H_1: \mu_2 \neq \mu_3$	$\mu_2 - \mu_3$	0.12	0.73	NO SIGNIFICATIVA		

TPH – 5 h

Tabla ANOVA						
Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	f (exp)	F tablas (α ; glr; gIE)	p-value
Tratamientos	2	15	8	23.00	3.47	0.0000
Error	21	7	0.33			
Total	23	22				
					SE RECHAZA H0	SE RECHAZA H0
Como $f > F$, se rechaza la hipótesis nula (H_0). Sí existen diferencias entre los filtros en la TPH						
Como $p\text{-value} < \alpha$, se rechaza H_0						
LSD						
Hipótesis	Diferencia poblacional	Diferencia muestral en valor absoluto	Valor LSD	Decisión		
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ vs $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	$\mu_1 - \mu_2$	0.74	0.60	SIGNIFICATIVA		
$H_0: \mu_1 = \mu_3$ vs $H_1: \mu_1 \neq \mu_3$	$\mu_1 - \mu_3$	1.19	0.60	SIGNIFICATIVA		
$H_0: \mu_2 = \mu_3$ vs $H_1: \mu_2 \neq \mu_3$	$\mu_2 - \mu_3$	1.93	0.60	SIGNIFICATIVA		

RH – 10 h

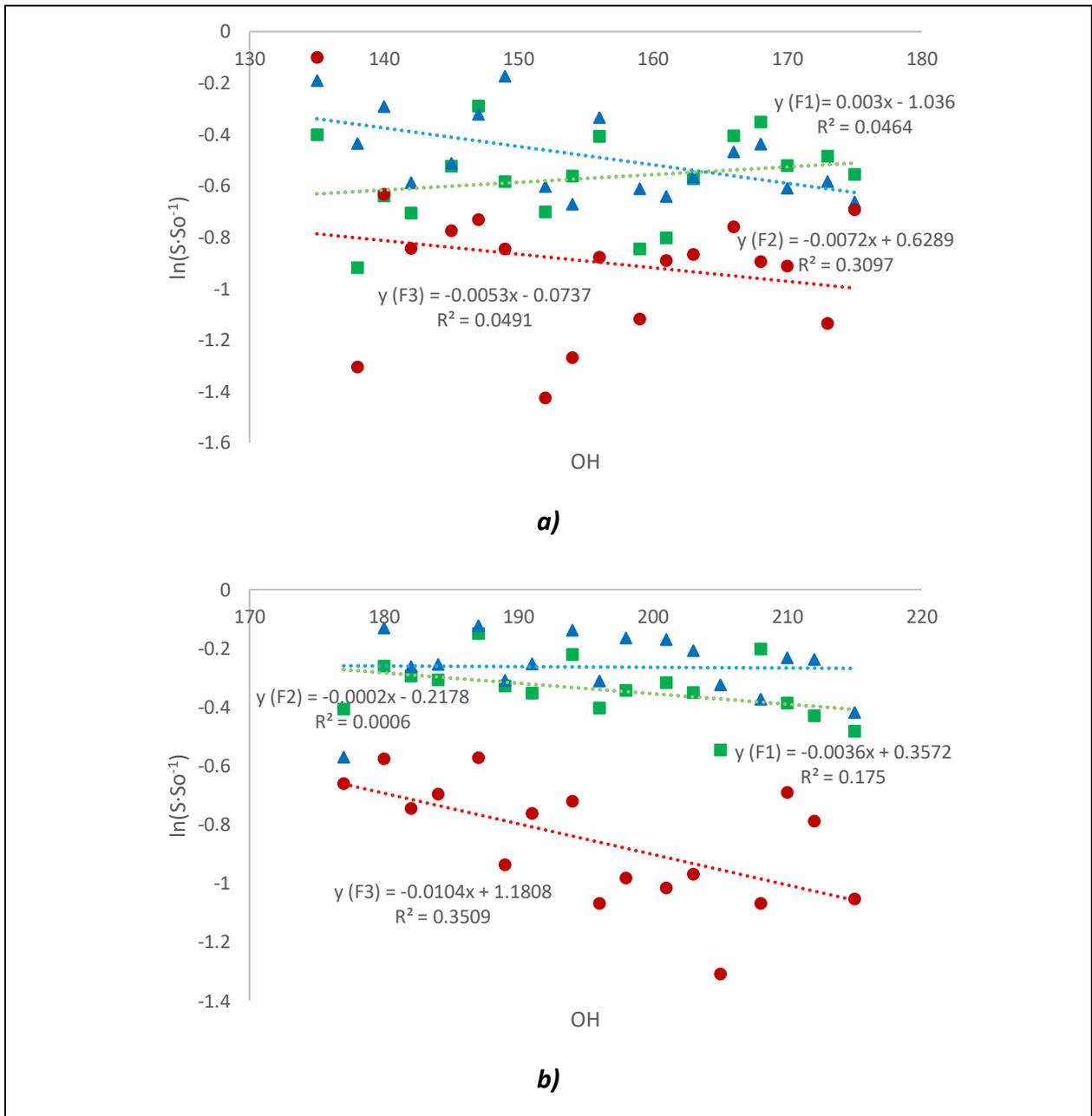
Tabla ANOVA						
Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	f (exp)	F tablas (α ; glr; glE)	p-value
Tratamientos	2	209,620	104,810	3.90	3.47	0.0362
Error	21	563,795	26,847.36			
Total	23	773,414				
					SE RECHAZA H0	SE RECHAZA H0
Como $f > F$, se rechaza la hipótesis nula (H_0). Sí existen diferencias entre los filtros en el RH						
Como $p\text{-value} < \alpha$, se rechaza H_0						
LSD						
Hipótesis	Diferencia poblacional	Diferencia muestral en valor absoluto	Valor LSD	Decisión		
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ vs $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	$\mu_1 - \mu_2$	68.39	170.37	NO SIGNIFICATIVA		
$H_0: \mu_1 = \mu_3$ vs $H_1: \mu_1 \neq \mu_3$	$\mu_1 - \mu_3$	223.39	170.37	SIGNIFICATIVA		
$H_0: \mu_2 = \mu_3$ vs $H_1: \mu_2 \neq \mu_3$	$\mu_2 - \mu_3$	155.00	170.37	NO SIGNIFICATIVA		

RH – 5 h

Tabla ANOVA						
Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	f (exp)	F tablas (α ; glr; gIE)	p-value
Tratamientos	2	807,973	403,987	11.40	3.47	0.0004
Error	21	744,235	35,439.76			
Total	23	1,552,208				
					SE RECHAZA H0	SE RECHAZA H0
Como $f > F$, se rechaza la hipótesis nula (H_0). Sí existen diferencias entre los filtros en el RH						
Como $p\text{-value} < \alpha$, se rechaza H_0						
LSD						
Hipótesis	Diferencia poblacional	Diferencia muestral en valor absoluto	Valor LSD	Decisión		
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ vs $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	$\mu_1 - \mu_2$	35.84	195.75	NO SIGNIFICATIVA		
$H_0: \mu_1 = \mu_3$ vs $H_1: \mu_1 \neq \mu_3$	$\mu_1 - \mu_3$	405.90	195.75	SIGNIFICATIVA		
$H_0: \mu_2 = \mu_3$ vs $H_1: \mu_2 \neq \mu_3$	$\mu_2 - \mu_3$	370.07	195.75	SIGNIFICATIVA		

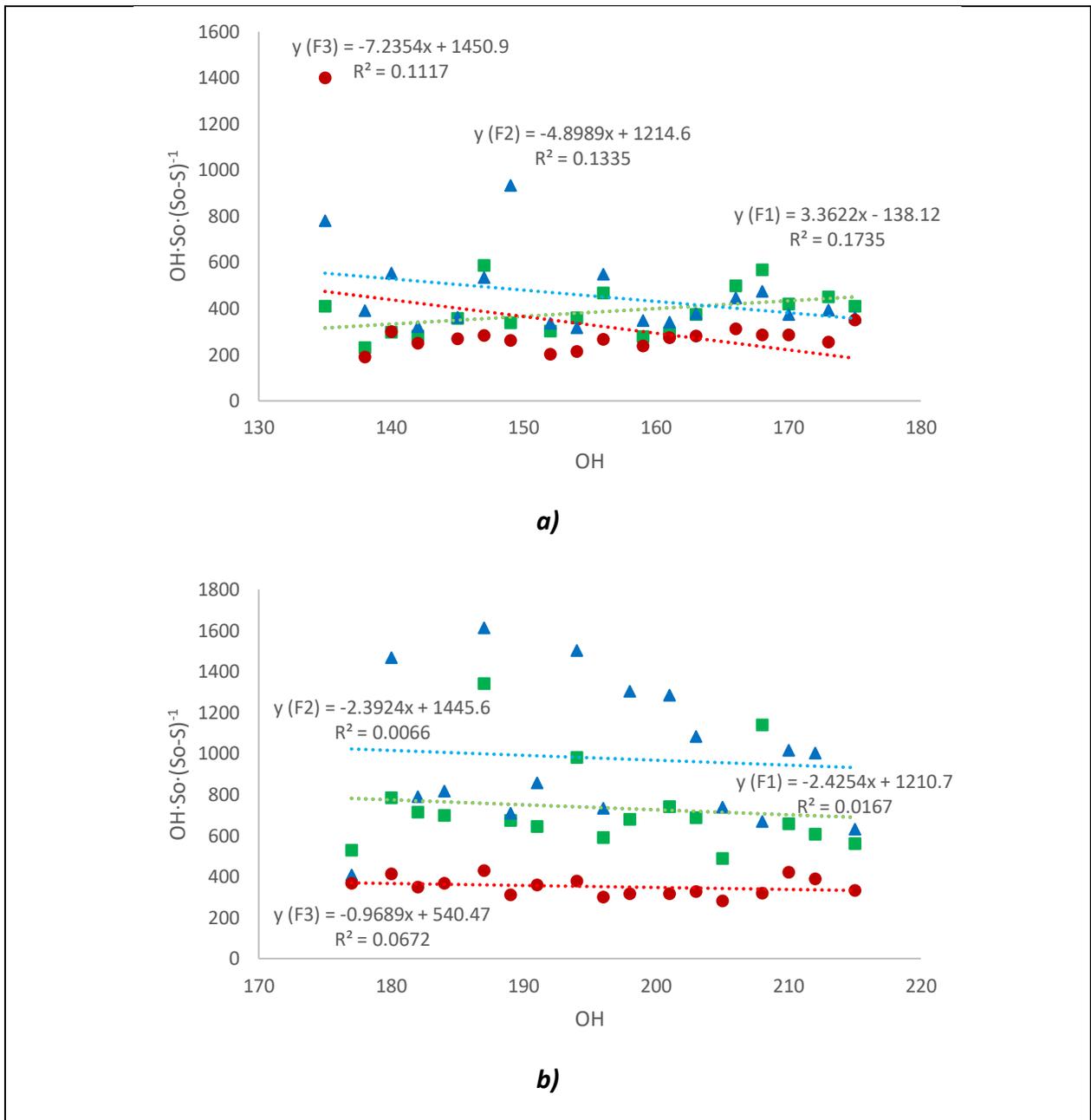
ANEXO 3. Cinéticas de degradación comparativas

Modelo de primer orden para TRH (a) 10 h y (b) 5 h



* OH = tiempo de operación

Modelo de Grau-segundo orden para TRH (a) 10 h y (b) 5 h



* OH = tiempo de operación

Referencias bibliográficas

- Albarez, R., Lovato, G., Ratusznei, S. M., Zaiat, M., y D. Rodrigues, J. A. (2018). Feasibility of biohydrogen production by co-digestion of vinasse (sugarcane stillage) and molasses in an ANSBBR. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 27-41.
- Albarrán Contreras, B. A. (Noviembre de 2017). Efecto de la velocidad superficial del gas sobre la producción de hidrógeno con vinazas vitivinícolas. Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México.
- Arreola-Vargas, J., Celis, L. B., Buitrón, G., Razo-Flores, E., y Alatraste-Mondragón, F. (2013). Hydrogen production from acid and enzymatic oat straw hydrolysates in an anaerobic sequencing batch reactor: Performance and microbial population analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 13884-13894.
- Arriaga Noguez, A. (2006). Vermicomposteo del bagazo de agave (Agave tequilana) generado en la industria tequilera. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Estado de México., Edo. Méx., México.
- Becerra Ospina, N. L. (2014). *Clarificación de vinaza de caña de azúcar por tratamiento fisicoquímico y filtración con membranas*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Bernal González, M., Poblano Flores, A., Toscano Pérez, D., y Durán de Bazúa, C. (2012). Ahorro de energía: Uso de reactores anaerobios termofílicos para la obtención de metano a partir de vinazas de ingenios azucareros-alcoholeros. Efecto de la temperatura en el desempeño de las biocomunidades anaerobias. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 27(2), pp. 80-88.
- Bittencourt Sydney, E., Larroche, C., Novak, A. C., Nouaille, R., Jyoti Sarma, S., Kaur Brar, S., . . . Soccol, C. R. (2014). Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. *Bioresource Technology*, 380-386.
- Blanco Lodoño, S. A. (2013). *Producción de biohidrógeno a través de la fermentación oscura de residuos – Revisión crítica (Tesis de maestría)*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Buitrón , 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*, 9071-9077.
- Buitrón , G., Prato- Garcia, D., y Zhang, A. (2014). Biohydrogen production from tequila vinasses using a fixed bed reactor. *Water Science and Technology*, 1919-1925.
- Buitrón Méndez, G., y Carvajal Monroy, C. (2009). Producción de hidrógeno a partir de aguas residuales. *Revista Digital Universitaria*, 1067-1079.
- Cabrera Díaz, A., y Díaz Marrero, M. Á. (2013). Tratamiento de vinaza cubana en un reactor anaerobio empacado de flujo ascendente. *Ingeniería hidráulica y ambiental*, 41-49.
- Comisión Nacional del Agua, CONAGUA. (2015). *Comisión Nacional del Agua*. Recuperado el Septiembre de 2017, de ANEAS: <http://aneas.com.mx/manual-de-agua-potable-alcantarillado-y-saneamiento-mapas-conagua-2015/>

- Comisión Nacional del Agua, CONAGUA. (2018). *Estadísticas del agua en México. Edición 2018*. Ciudad de México, Méx.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, SEMARNAT.
- Consejo Regulador del Tequila, CRT. (2020). *Consejo Regulador del Tequila*. Recuperado el mayo de 2020, de <https://www.crt.org.mx/index.php/es/>
- CyD. (2017). *Ciencia y Desarrollo*. Recuperado el 2018, de <http://www.cienciaydesarrollo.mx/?p=articulo&id=287>
- da Silva, S. C., Amaral Moravia, M. C., y Fonseca Couto, C. (2020). Combined process of ultrafiltration and nanofiltration for vinasse treatment with and without pre-coagulation. *Journal of Water Process Engineering*, 101326.
- El Universal. (18 de Marzo de 2017). *El Universal*. Obtenido de <http://www.eluniversal.com.mx/entrada-de-opinion/colaboracion/orgullomexicano/periodismo-de-investigacion/2017/03/18/la-mexicana>
- Espinoza-Escalante, F. M., Pelayo-Ortíz, C., Navarro-Corona, J., González-García, Y., Bories, A., y Gutierrez-Pulido, H. (2009). Anaerobic digestion of the vinasses from the fermentation of Agave tequilana Weber to tequila: The effect of pH, temperature and hydraulic retention time on the production of hydrogen and methane. *Biomass and Bioenergy* 33, 14-20.
- Estrada-Arriaga, E. B., Reynoso-Deloya, M. G., Guillén-Garcés, R. A., Falcón-Rojas, A., y García-Sánchez, L. (2021). Enhanced methane production and organic matter removal from tequila vinasses by anaerobic digestion assisted via bioelectrochemical power-to-gas. *Bioresource Technology*, 9.
- Faekah, N., Fatihah, S., y Samba Mohamed, Z. (2020). Kinetic evaluation of a partially packed upflow anaerobic fixed film reactor treating low-strength synthetic rubber wastewater. *Heliyon* 6, e03594.
- Fernández-Polanco, F., y Seghezzo, L. (2015). *Diseño de reactores Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB)*. Valladolid, España: Instituto Nacional de Tecnología Industrial y Delegación de la Comisión Europea en Argentina.
- Ferral Pérez, H. (2015). *Tratamiento de vinazas tequileras por coagulación-floculación empleando un biopolímero acoplado a ozonación catalítica*. Ciudad de México: Instituto Politécnico Nacional, UPIBI.
- Gabriel, D., y Sierra, H. (2017). *Purificación y usos del biogás*. Barcelona, España: Universidad Autónoma de Barcelona.
- García Solano, M. (2014). *Caracterización dinámica de un digestor anaerobio de vinazas tequileras mediante señales de pH*. Xalapa, Ver.: Universidad Veracruzana.
- García-Becerra, M., Macías-Muro, M., Arellano-García, L., y Aguilar-Juarez, O. (2019). Biohydrogen production from tequila vinasses: Effect of detoxification with activated charcoal on dark fermentation performance. *International Journal of Hydrogen Energy* 44, 31860-31872.
- 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*, 151-160.
- García-Depraect, O., Diaz-Cruces, V. F., Rene, E. R., y León-Becerril, E. (2020a). Changes in performance and bacterial communities in a continuous biohydrogen-producing reactor subjected to substrate- and pH-induced perturbations. *Bioresource Technology*, 5.

- García-Depraect, O., Gómez-Romero, J., León-Becerril, E., y López-López, A. (2017). A novel biohydrogen production process: Co-digestion of vinasse and Nejayote as complex raw substrates using a robust inoculum. *International Journal of Hydrogen Energy*, 5820-5831.
- García-Depraect, O., Muñoz, R., van Lier, J. B., Rene, E. R., Diaz-Cruces, V. F., y León-Becerril, E. (2020b). Three-stage process for tequila vinasse valorization through sequential lactate, biohydrogen and methane production. *Bioresource Technology* 307, 123160.
- García-Depraect, O., Rene, E. R., Diaz-Cruces, V. F., y León-Becerril, E. (2019). Effect of process parameters on enhanced biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate-acetate pathway. *Bioresource Technology*, 618-626.
- González-Ugalde, C., y Durán-Herrera, J. E. (2014). Producción de hidrógeno a partir del tratamiento anaerobio de vinazas en un reactor UASB. *Tecnología en Marcha*, 3-12.
- Guadarrama Pérez, O. (14 de Agosto de 2017). Caracterización de un sistema híbrido de celda de combustible microbiana productora de hidrógeno-celda de combustible de hidrógeno para la producción de electricidad. Jiutepec, Morelos, México.
- Houbron, E., Sandoval Rojas, M. E., y Hernández Muñoz, A. F. (2016). Tratamiento de vinazas en un reactor de lecho fluidizado inverso anaerobio. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 255-266.
- IDAE. (2007). *Biomasa: Digestores anaerobios*. Madrid, España: BESEL, S.A. (Departamento de Energía).
- Íñiguez, G., y Hernández, R. (2010). Estudio para la rehabilitación de una planta de tratamiento de vinazas tequileras mediante un floculante polimérico de poliacrilamida (PAM). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 26(4), pp. 299-311.
- Karapinar Kapdan, I. (2004). Kinetic analysis of dyestuff and COD removal from synthetic wastewater in an anaerobic packed column reactor. *Process Biochemistry* , 2545-2550.
- Kumar Verma, A., Bhunia, P., y Roshan Dash, R. (2014). Carbonaceous organics removal kinetics in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating physico-chemically pre-treated textile wastewater. *Desalination and Water Treatment*, 1-12.
- Lebron, Y. A., Moreira, V. R., Furtado, T. P., da Silva, S. C., Lange, L. C., y Amaral, M. C. (2020). Vinasse treatment using hybrid tannin-based Coagulation-Microfiltration-Nanofiltration processes: Potential energy recovery, technical and economic feasibility assessment. *Separation and Purification Technology* , 117152.
- López Castillo, H. (1 de diciembre de 2008). Desarrollo del proceso anammox para el tratamiento de lixiviados : puesta en marcha y aplicación. Girona, Cataluña, España.
- López López, A., Davila Vazquez , G., León Becerril, E., Villegas García, E., y Gallardo Valdez, J. (2010). Tequila vinasses: generation and full scale treatment processes. *Environmental Science and Biotechnology*, 109-116.
- Lorenzo Acosta, Y., y Obaya Abreu, M. C. (2005). La Digestión Anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 35-48.
- Lorenzo-Acosta, Y., Doménech-López, F., Eng-Sánchez, F., Almazán-del Olmo, O., y Chanfón-Curbelo, J. M. (2015). Tratamiento industrial de vinazas de destilerías en reactores UASB. *Tecnología Química*, 108-123.
- Marques dos Reis, C., Fronja Carosia, M., Kimiko Sakamoto, I., Amâncio Varesche, M. B., y Luiz Silva, E. (2015). Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane vinasse in an anaerobic fluidized bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 8498-8509.

- Martí Ortega, N. (2006). *Phosphorus Precipitation in Anaerobic Digestion Process*. Boca Raton, Florida USA: Universal-Publishers.
- México. (2015). *México*. Recuperado el 2018, de <https://www.mexico.mx/es/articulos/bebidas-alcoholicas-que-generan-empleos>
- Moreno Rodríguez, G., Espinosa Fuentes, A., y Briones Méndez, R. S. (2007). Tratamiento anaerobio de aguas residuales. *Programa de capacitación para el subsector agua potable y saneamiento* (pág. 191). Mérida, Yucatán: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- Niz, M. Y., Etchelet, I., Fuentes, L., Etchebehere, C., y Zaiat, M. (2019). Extreme thermophilic condition: An alternative for long-term biohydrogen production from sugarcane vinasse. *International Journal of Hydrogen Energy*, 22876-22887.
- NOM-006-SCFI-2012. (2016). *Diario Oficial de la Federación*. Recuperado el 2017, de NORMA Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012, Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5282165&fecha=13/12/2012.
- Nunes Ferraz Júnior, A. D., Etchebehere, C., y Zaiat, M. (2015). Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: Influence of support materials. *Anaerobe*, 94-105.
- Padilla Gasca, E. (2010). *Evaluación de un filtro anaerobio de flujo ascendente para tratar agua residual de rastro*. Guadalajara, Jal., Méx.: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C.
- Parra Orobio, B. A. (2014). *Producción de metano a partir de la digestión anaerobia de biorresiduos de origen municipal*. Cali, Colombia: Universidad del Valle.
- Red Española de Compostaje. (2012). *De residuo a recurso: El camino hacia la sostenibilidad. Ingeniería y aspectos técnicos de la digestión anaeróbica*. Madrid, España: Mundi-Prensa Libros.
- Retes Pruneda, J. L. (2014). *Biorremediación de vinazas de la industria tequilera y mezcalera mediante tratamiento fisicoquímico y biológico*. Aguascalientes, México: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Robles González, V. S., y Villalobos Castillejos, F. (2009). *Vinazas mezcaleras: Un problema de contaminación ambiental*. Oaxaca: Instituto de Agroindustrias.
- San Miguel, G., y Gutiérrez Martín, F. (2015). *Tecnologías para el uso y transformación de biomasa energética*. Madrid, España: Ediciones Paraninfo, S.A. Mundi-Prensa.
- Santos, S. C., Ferreira Rosa, P. R., 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.
- Shan-Fei, F., Xiao-Hui, X., Meng, D., Xian-Zheng, Y., y Rong-Bo, G. (2017). Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. *Process Safety and Environmental Protection*, 81-86.
- Sosa Villalobos, C. A. (2013). *Aplicación de un tratamiento biológico a las aguas residuales provenientes de una destilería de alcohol de caña, utilizando un reactor UASB*. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid.
- Sotelo Navarro, P. X. (Abril de 2017). Producción de bioH₂ por fermentación oscura a partir de pañales desechables usados. Ciudad de México, Universidad Autónoma Metropolitana Azcapotzalco, México.

- Torres, P., Cardoso, A., y Rojas, O. (2004). Mejoramiento de la calidad de lodos. Influencia de la adición de cloruro férrico. *Ingeniería y Competitividad*, 23-31.
- Torres, P., Pérez, A., Cajigas, Á. A., Jurado, C., y Ortiz, N. (2007). Selección de inóculos para el tratamiento anaerobio de aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente*, 105-111.
- Travieso, L., Benítez, F., Sánchez, E., Borja, R., León, M., Raposo, F., y Rincón, B. (2008). Performance of a Laboratory-scale Microalgae Pond for Secondary Treatment of Distillery Wastewaters. *Chemical, Biochemical, Engineering*, 22(4), pp. 467-473.
- Vongvichiankul, C., Deebao, J., y Khongnakorn, W. (2017). Relationship between pH, Oxidation Reduction Potential (ORP) and Biogas Production in Mesophilic Screw Anaerobic Digester. *Energy Procedia*, 877-882.
- Zampol Lazaro, C., Perna, V., Etchebehere, C., y Varesche, M. B. (2014). Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy* 39, 6407-6418.