



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA

INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE LACTOSUERO EN UN
REACTOR DE LECHO EXPANDIDO

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:

MANUEL ALEJANDRO CUAUTLE MARÍN

TUTOR PRINCIPAL

DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR

DRA. PETIA MIJAYLOVA NACHEVA, INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA
DEL AGUA

DR. OSCAR GONZÁLEZ BARCELÓ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

Jurado Asignado

Presidente	<i>Dr. Gregorio Jorge Gómez Hernández</i>	<i>UAM - Iztapalapa</i>
Secretario	<i>Dra. Petia Mijaylova Nacheva</i>	<i>IMTA</i>
1er. Vocal	<i>Dr. Edson Baltazar Estrada Arriaga</i>	<i>IMTA</i>
2do. Vocal	<i>Dr. Oscar González Barceló</i>	<i>Instituto de Ingeniería</i>
3er. Vocal	<i>Dr. Germán Buitrón Méndez</i>	<i>Instituto de Ingeniería</i>

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas,
Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería, UNAM

Tutor de tesis

Nombre

Firma

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por el proyecto CONACYT Ciencia Básica
251718

Agradecimientos a Gloria Moreno Rodríguez y Jaime Pérez Trevilla por su apoyo
técnico en el laboratorio

Dedicatoria

Tabla de contenido

1. Introducción.....	3
2. Objetivos	6
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos.....	6
3. Marco teórico y fundamentos de la investigación.....	7
3.1. Introducción	7
3.2. Lactosuero ácido	7
3.3. Biohidrógeno.....	9
3.4. Fermentación oscura.....	10
3.4.1. Biorreactores	12
3.4.2. Gránulos anaerobios	16
3.4.3. Transferencia de masa	17
3.4.4. Hidrodinámica del EGSB	22
3.4.5. Sistema integral para el tratamiento de aguas residuales y producción de energía	24
4. Efecto del estrés hidrodinámico en un reactor EGSB para la producción de hidrógeno y disminuir la de metano usando lodo granular metanogénico.....	26
4.1. Introducción	26
4.2. Materiales y métodos.....	27
4.2.1. Diseño y construcción de un Reactor EGSB.....	27
4.2.2. Sustrato e inóculo.....	28

4.2.3. Estrategia experimental.....	29
4.2.4. Técnicas analíticas.....	29
4.3. Resultados.....	29
4.4. Conclusiones.....	39
5. <i>Producción de biohidrógeno a partir de lactosuero ácido en un reactor EGSB: efecto del hidróxido o bicarbonato de sodio para el control del pH</i>	40
5.1. Introducción	40
5.2. Materiales y métodos.....	41
5.2.1. Diseño y construcción de un Reactor EGSB.....	41
5.2.2. Sustrato e inóculo.....	42
5.2.3. Estrategia experimental.....	42
5.2.4. Técnicas analíticas.....	43
5.3. Resultados.....	44
5.3.1. Aclimatación.....	44
5.3.2. Efecto de la carga orgánica y agente para el control de pH en la producción de biohidrógeno	44
5.4. Conclusiones.....	54
Anexo 1: Diagrama para la construcción del reactor EGSB.....	56
Anexo 2: Productividad académica durante el proyecto de investigación	57
Bibliografía	58

Índice de figuras

Figura 1. Variación de la energía libre de Gibbs debido al pH para la producción de hidrógeno: A) acetato, B) butirato, C) butirato/acetato, D) etanol acetato.....	9
Figura 2. Procesos biológicos para la producción de hidrógeno.....	10
Figura 3. Factores que afectan la fermentación oscura	10
Figura 4. Producción de biogás (H ₂ y CO ₂) en relación con el crecimiento celular, pH, potencial redox y consumo de sustrato durante fermentación oscura a 35°C	13
Figura 5. Clasificación de biorreactores.....	14
Figura 6. Esquema de un reactor EGSB	15
Figura 7. Los gránulos pueden ser considerados como superficies porosas catalíticas.....	17
Figura 8. Esquema general de los fenómenos en un reactor EGSB	18
Figura 9. Esquema de los diversos fenómenos alrededor de un gránulo.....	22
Figura 10. Distribución del influente en el fondo del reactor, los colores representan la velocidad (Yang et al., 2015).....	22
Figura 11. Concepto de biorrefinería integral biohidrógeno (Show et al., 2012)	25
Figura 12. Medidas del biorreactor EGSB (cm), B) Vista explosionada de los componentes del EGSB.....	28
Figura 11. Esquema de operación EGSB.....	28
Figura 12. Evolución de la composición del biogás.....	30
Figura 13. Efecto de la velocidad ascensional sobre la productividad y el rendimiento.....	30
Figura 14. Comportamiento del Número de Reynolds y Peclet en función de la velocidad ascensional	31
Figura 15. Comportamiento de la productividad en función del Número de Reynolds (Eje x inferior) y Peclet (Eje x superior).....	32
Figura 16. Relación entre la velocidad ascensional y la velocidad de corte (γ).....	32
Figura 17. Efecto de la velocidad de corte sobre la eficiencia de degradación de glucosa	33
Figura 18. Evolución del diámetro granular (Sauter) en el tiempo.....	34
Figura 19. Influencia del diámetro granular sobre la velocidad de sedimentación.....	34
Figura 20. Microfotografías de gránulos anaerobios A) Biomasa inicial, B) 35y D) 45 días de operación	35
Figura 21. Comportamiento de ácidos orgánicos en porcentaje molar	36
Figura 22. Producción de metabolitos en función de la productividad de BioH ₂	36
Figura 23. Efecto de la velocidad de corte sobre el coeficiente de transferencia k_c	37
Figura 24. Efecto de la dispersión (Pe_{axial}) sobre el coeficiente k_c	38
Figura 25. Efecto de la velocidad de corte sobre el coeficiente kLa	38
Figura 26. Esquema de operación EGSB.....	42
Figura 27. Evolución del biogás en el tiempo, fase de hidróxido.....	45
Figura 28. Evolución del biogás en el tiempo, fase de bicarbonato.....	45
Figura 29. Efecto de la carga orgánica sobre la concentración de hidrógeno.....	46
Figura 30. Efecto de la carga orgánica sobre la productividad de hidrógeno	47
Figura 31. Efecto de la carga orgánica en la eficiencia de degradación de Azúcares Totales.....	48
Figura 32. Función de densidad del diámetro granular A) Fase de hidróxido y B) Fase de bicarbonato	50
Figura 33. Fotografías de los gránulos A) Inicio de la experimentación B) Final experimentación con hidróxido C) Final experimentación con bicarbonato	51

<i>Figura 34. Efecto de la velocidad de corte sobre el coeficiente k_c.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 35. Efecto de la carga orgánica sobre el número de Reynolds.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 36. Efecto de la carga orgánica sobre el k_{La}</i>	<i>54</i>

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Producción de biohidrógeno utilizando lactosuero.....</i>	<i>11</i>
<i>Tabla 2 Reacciones para la producción de hidrógeno a partir de glucosa (Ruggeri et al., 2015a, p. 2).....</i>	<i>12</i>
<i>Tabla 3. Relaciones adimensionales para la determinación de k_c</i>	<i>19</i>
<i>Tabla 4. Coeficientes de difusión en agua a 25°C (Stewart, 2003)</i>	<i>20</i>
<i>Tabla 5. Caracterización del lactosuero ácido.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 6. Estudios realizados para la evaluar la producción de hidrógeno con lactosuero ácido.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabla 7. Valores de velocidad de sedimentación y velocidad de corte promedio para el diámetro granular de las fases de hidróxido y bicarbonato</i>	<i>52</i>

Nomenclatura

Abreviatura	Descripción	Unidades
μ_{aq}	Viscosidad del agua	Pa·s
μ_L	Viscosidad del lactosuero	Pa·s
a_g	Área granular	m ²
C_s	Concentración de H ₂ en equilibrio	mol·L ⁻¹
D_A	Coefficiente de dispersión axial	Adimensional
D_{aq}	Coefficiente de difusión en agua a condiciones estándar	m ² ·s ⁻¹
D_c	Coefficiente de difusión efectivo (corregido)	m ² ·s ⁻¹
d_{ms}	Diámetro granular (Diámetro medio Sauter)	m
dp	Coefficiente de diámetro de partícula	Adimensional
$d_{reactor}$	Diámetro del reactor	m
EGSB	Expanded Granular Sludge Bed	
h	Altura del reactor	m
kc	Coefficiente global de transferencia de masa líquido-sólido	m·h ⁻¹
k_{La}	Coefficiente volumétrico de transferencia de masa	h ⁻¹
NA	Flux de sustrato por convección de la especie A	mol·s ⁻¹ m ⁻²
n_j	Altura normalizada	Adimensional
P°_G	Presión parcial de H ₂	atm
Pe_{axial}	Número de Peclet (Dispersión axial)	Adimensional
R	Radio granular (superficie)	m ²
Re	Número de Reynolds	Adimensional
Re_g	Número de Reynolds granular	Adimensional
r_g	Radio granular	m
Sc	Número de Schmidt	Adimensional
Sh	Número de Sherwood	Adimensional
TRH	Tiempo de Retención Hidráulico	h
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket	
U_t	Velocidad de sedimentación	m·h ⁻¹
ν	Viscosidad cinemática	m ² ·s ⁻¹
V_s	Velocidad ascensional	m·h ⁻¹
V_{sg}	Velocidad ascensional generada por el biogás	m·h ⁻¹
z	Posición axial	Adimensional
ΔC_A	Gradiente de concentración	mol·L ⁻¹
ϵ_G	Gas Holdup	m·h ⁻¹
ρ_{aq}	Densidad del agua	kg·m ⁻³

ρ_g	<i>Densidad granular</i>	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
ρ_L	<i>Densidad del lactosuero</i>	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
γ	<i>Velocidad de corte</i>	s^{-1}

Resumen

La producción de biológica de hidrógeno (biohidrógeno) está dirigida hacia el uso de sustratos económicamente viables, procesos estables y potencialmente escalables. Además, es necesario que un bioproceso como este sea consistente en cuanto a producción de biohidrógeno y metabolitos, por lo que un inóculo resistente a la variabilidad en la composición del agua residual es de vital importancia. La experimentación se dividió en 2 etapas. En la primera etapa se estudió el efecto del estrés hidrodinámico en un reactor continuo EGSB (expanded granular sludge bed), alimentado con glucosa para la producción de biohidrógeno usando lodo granular metanogénico. En esta etapa se probaron cuatro velocidades ascensionales (V_s) 0.3, 2, 3 y 5 $m \cdot h^{-1}$, tiempo de retención hidráulico (TRH) fue de 4.5 horas, pH controlado a 4.5 y a una temperatura de 35°C. Se estimaron números adimensionales de Reynolds (Re) y Peclet axial (Pe_{axial}), además de la velocidad de corte promedio (γ) y velocidad de sedimentación para conocer el comportamiento hidrodinámico en el reactor y su efecto en los gránulos. Se obtuvo una productividad máxima de $1.62 \text{ LH}_2 \cdot \text{L}_{\text{reactor}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, un rendimiento de 1.8 moles de $\text{H}_2 \cdot \text{mol}$ de glucosa $^{-1}$ y una eficiencia de degradación de glucosa del 94.7%. Se observó que la concentración de etanol y acetato aumentan de forma proporcional a la velocidad de corte, alcanzando una saturación máxima de etanol más acetato del 96%. Las condiciones de estrés causaron la reducción del diámetro granular en un 50% e hicieron disminuir la velocidad de sedimentación de 88.4 a 38.4 $m \cdot h^{-1}$. La velocidad de corte máxima (γ) fue de 30.4 s^{-1} a una V_s de 5 $m \cdot h^{-1}$, además se estima que esta V_s produjo un régimen de flujo laminar en el reactor ($Re= 64$). El mezclado es cercano a la mezcla completa ($Pe_{axial}= 47.9$).

La segunda etapa consistió en la producción de biohidrógeno usando lactosuero ácido en un reactor EGSB: Influencia del hidróxido de sodio o bicarbonato de sodio para el control de pH. En esta etapa se probaron dos fases experimentales, para cada fase se evaluaron cuatro velocidades de carga orgánicas, la primera etapa usando hidróxido y la segunda usando bicarbonato. El reactor EGSB fue operado con un TRH de 4.5 horas y pH de 4.5, la velocidad ascensional fue de 5 $m \cdot h^{-1}$ (estableciendo las condiciones hidrodinámicas de la primera etapa). Las máximas productividades con hidróxido y bicarbonato de sodio fueron de 4.34 y 0.4 $\text{LH}_2 \cdot \text{L}_{\text{reactor}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente. El suministro de bicarbonato a la fase líquida puede incrementar la concentración de dióxido de carbono, esto debido al equilibrio de carbonatos. El diámetro granular disminuyó progresivamente en la fase de hidróxido y por el contrario aumentaba el diámetro granular en la fase con bicarbonato.

1. Introducción

El hidrógeno se considera un vector energético ideal, amigable con el ambiente, ya que el producto de su combustión es vapor de agua; además, su uso en celdas de combustible para la producción de energía eléctrica limpia en automóviles se ha expandido en los últimos años, como lo demuestra la empresa Shell y su programa para la instalación de una red de abastecimiento de hidrógeno en toda Alemania=(*Shell Global, 2016*).

Los métodos de producción de hidrógeno pueden ser químicos, electrolíticos, termoquímicos, fotolíticos y biológicos, que pueden usar distintos tipos de materia prima, incluyendo fuentes fósiles como el gas natural y carbón, como también fuentes renovables como biomasa. Sin embargo, el uso de combustibles fósiles para generar hidrógeno no es sustentable ya que por cada tonelada de H₂ se producen 11 de dióxido de carbono.

La fermentación oscura, fotofermentación y biofotólisis (directa o indirecta) son bioprocesos capaces de producir hidrógeno. Los primeros dos procesos son anaerobios que utilizan carbohidratos y ácidos grasos volátiles, respectivamente. Mientras que la fotólisis es a partir de la luz solar y agua para la forma directa, mientras que para la indirecta se usa el glucógeno generado en la fotosíntesis para generar H₂.

Específicamente, la fermentación oscura ha sido empleada para producir hidrógeno a partir de sustratos como: vinaza (*Buitrón y Carvajal, 2010*), residuos lignocelulósicos (*Kapdan y Kargi, 2006*), residuos de la industria del aceite (Atif et al., 2005), de la industria del maíz (*Zhang et al., 2007*), melaza (*Guo et al., 2008a*), entre otros. Esto sugiere que la fermentación oscura es versátil y atractiva para la producción de hidrógeno

La

La

- Actividad de biomasa en la degradación del sustrato
- Limitaciones termodinámicas
- Concentración la biomasa
- Biodegradabilidad del sustrato
- Disponibilidad del sustrato y fenómenos de transporte

Los

La

Todos estos factores interactuando entre si resultan en un comportamiento hidrodinámico definido para cada biorreactor. Conocer estas interacciones provee un mejor entendimiento de lo que pasa y permite controlar las variables críticas en el momento necesario

En

Frente a la creciente demanda del hidrógeno en el mercado y con la fermentación oscura apuntando hacia esa dirección, es necesario hacer frente a los posibles problemas que implican tratar aguas residuales complejas, por lo que se investiga la producción biológica de hidrógeno a partir de lactosuero, además del análisis hidrodinámico desempeñado en las diferentes etapas, dilucidando los fenómenos limitantes, variables independientes y posibles mejoras.

2.

Objetivo

- Evaluar la producción de biohidrógeno a partir de lactosuero ácido empleando un reactor de lecho expandido (EGSB).

Objetivos

- Generar un inóculo productor de hidrógeno mediante estrés hidrodinámico suministrando agua residual sintética.
- Evaluar el régimen hidrodinámico del reactor mediante relaciones adimensionales desarrollado en las diferentes velocidades ascensionales, su efecto en la producción de hidrógeno y en los gránulos anaerobios.
- Evaluar el efecto de la carga orgánica y el agente para control de pH (hidróxido de sodio o bicarbonato de sodio) sobre la producción de biohidrógeno a partir de lactosuero ácido.
- Evaluar el efecto de la carga orgánica y el agente para el control del pH en el régimen hidrodinámico del reactor mediante relaciones adimensionales y su efecto sobre los gránulos.

3. Marco teórico y fundamentos de la investigación

3.1.

El aumento de la población mundial, urbanización e industrialización han conducido al incremento de la demanda energética y la generación aguas residuales.

Alrededor del 85% del total de energía generada mundialmente es producida por combustibles fósiles, desafortunadamente son no renovables, además, producen contaminantes como: CO, CO₂, C_nH_m, SO_x, NO_x, radiactividad, metales pesados, cenizas, etc., que generan afectaciones al sistema climático debido al incremento del efecto invernadero (*Momirlan y Veziroglu, 2002*).

El hidrógeno es un vector energético alternativo a los combustibles fósiles y puede considerarse como ideal, no genera emisiones y su capacidad calorífica por unidad de masa frente al de la gasolina es 2.3 veces mayor. Sin embargo, la mayor parte de la producción de H₂ es a través de procesos termoquímicos utilizando petróleo para generarlo; por lo que el desarrollo de métodos alternos de generación es importante; así, el llamado biohidrógeno es la generación de este gas por métodos biológicos que además son procesos amigables con el ambiente (*Sherif et al., 2014*).

La Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) reporta la generación de 210.26 m³·s⁻¹ de agua residual de uso no municipal, que incluye la generación de aguas residuales industriales, de las cuales se tratan 60.72 m³·s⁻¹ que representa el 5.9%, con una remoción de 1.3 millones de toneladas de DBO (demanda bioquímica de oxígeno) esto significa que se remueven 0.67 kg DBO·m⁻³ de agua residual (*CONAGUA, 2014*), cifra nada alentadora pero dirige el rumbo para la aplicación de tecnologías emergentes no sólo para el tratamiento de aguas residuales, sino para la obtención de energía, reúso del agua e incluso generación de productos de valor agregado.

3.2.

El

De

Existen

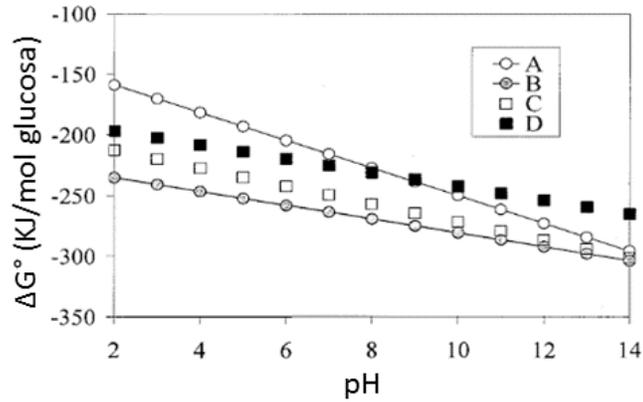
El

Debido

- Incompleta conversión de los azúcares
- Producción limitada debido a la inestabilidad del pH

- Ensuciamiento del reactor
- Limitaciones en transferencia de masa

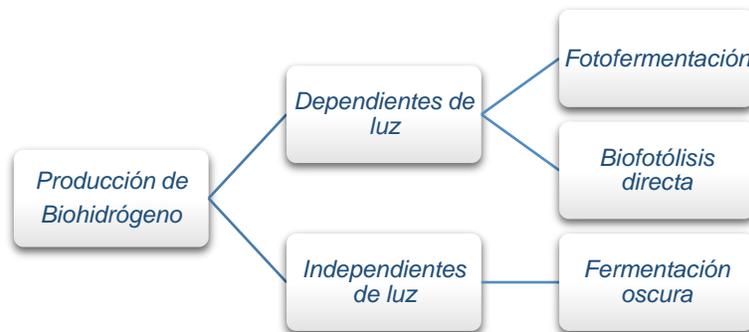
La



Figura

La hidrodinámica del biorreactor lo determina el tipo de agua residual y las características de operación de reactor. La intensidad de mezclado, el tipo de biorreactor (CSTR, UASB, EGSB, entre otros) hace que las fases líquida-sólida-gas interactúen de tal forma que cada reactor se comporta de forma diferente (Peña et al., 2006).

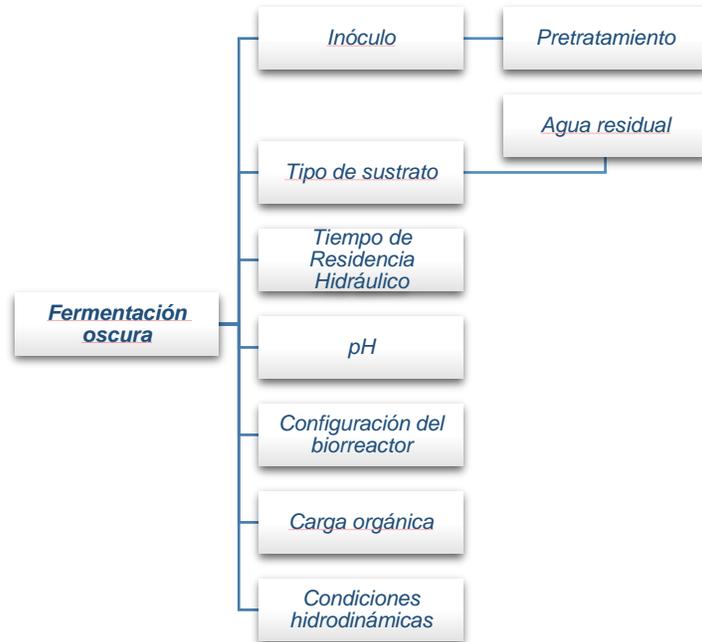
Todos
3.3.
Existen
Debido



Figura

3.4. Fermentación oscura

La



Figura

Tabla

Lactosuero	Productividad (LH ₂ L ⁻¹ d ⁻¹)	Rendimiento (mol H ₂ /mol lactosa)	Carga (g DQO L ⁻¹ d ⁻¹)	Inóculo	pH	Tipo de reactor	TRH (h)	Operación	Detección de metano	Referencia
Polvo	1.08	1.12	14.6	Consortio productor de H ₂ - polietileno (material de soporte)	4-4.5	Tubular	7	SBR	No	(Lima et al., 2016)
Polvo	0.36	0.34	20	Lodo granular metanogénico	Variable	UASB	6	Continuo	Si	(Carrillo-Reyes et al., 2012)
Líquido	0.8	1.52	10	Lodo anaerobio	-	CSTR (Termofílico)	24	Continuo	si	(Azbar et al., 2009)
Líquido	0.122	0.0061 g H ₂ /g DQO	20	Lodo anaerobio	5	UASB	12	Continuo	si	(Castelló et al., 2009)
Polvo	-	1.1	37	Autóctono, polietileno (material de soporte)	>5	Upflow anaerobic packed bed reactor	24	Continuo	No	(Perna et al., 2013)
Líquido	0.31	0.5	12.5	Lodo anaerobio (Espuma de poliuretano)	-	Tubular fixed bed reactor	48	-	No	(Fernández et al., 2014)
Polvo	1	2.3	14 g lactosa L ⁻¹ d ⁻¹	Lodo anaerobio	<5	CSTR	24	Continuo	Si	(Yang et al., 2007)
Líquido	2.9	-	60	Autóctono	5-6	CSTR	24	Continuo	No	(Venetsaneas

Los

Tabla

<i>Producto final</i>	<i>Reacción</i>
<i>Hidrógeno</i>	$C_6H_{12}O_6$
<i>Acetato</i>	$C_6H_{12}O_6$
<i>Etanol/acetato</i>	$C_6H_{12}O_6$
<i>Etanol</i>	$C_6H_{12}O_6$
<i>Acetato/butirato</i>	$4C_6H_{12}O_6$
<i>Butirato</i>	$C_6H_{12}O_6$
<i>Propionato</i>	$C_6H_{12}O_6$
<i>Acetato/propionato</i>	$C_6H_{12}O_6$

Las

3.4.1. *Biorreactores*

La

La

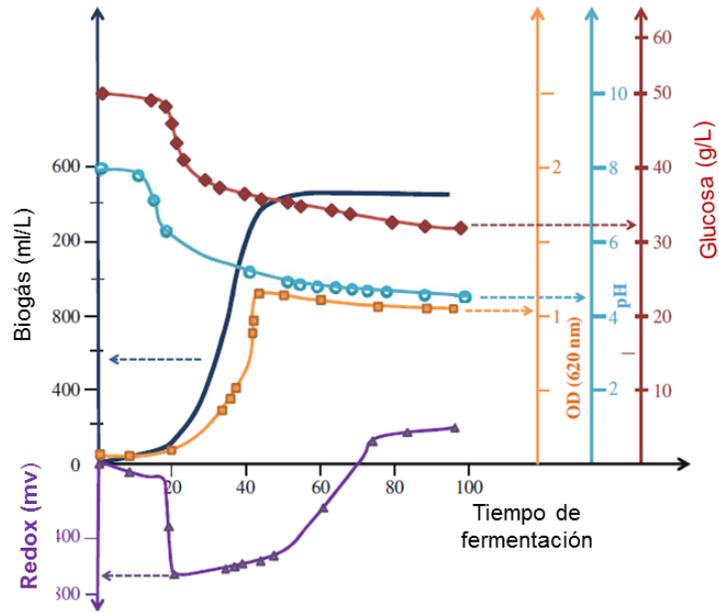
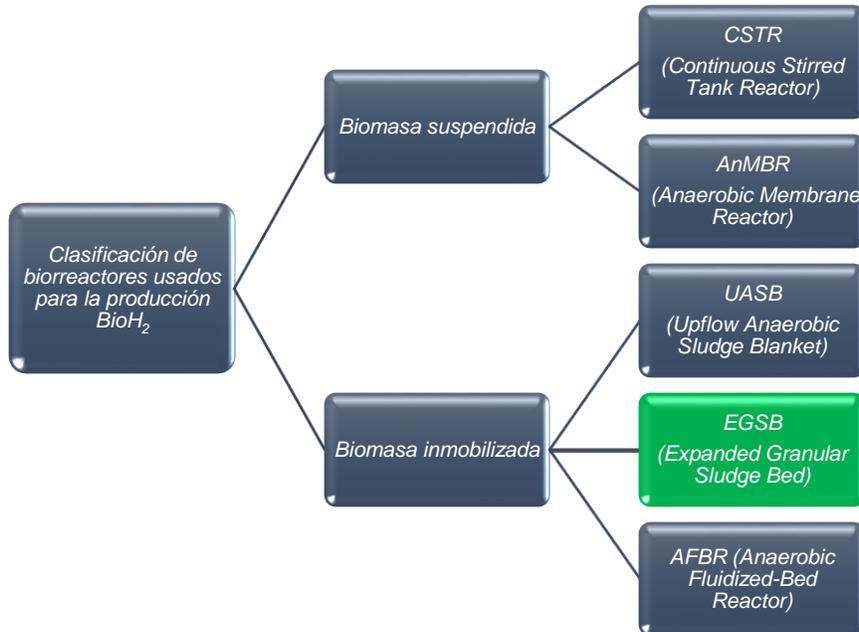


Figura
Para

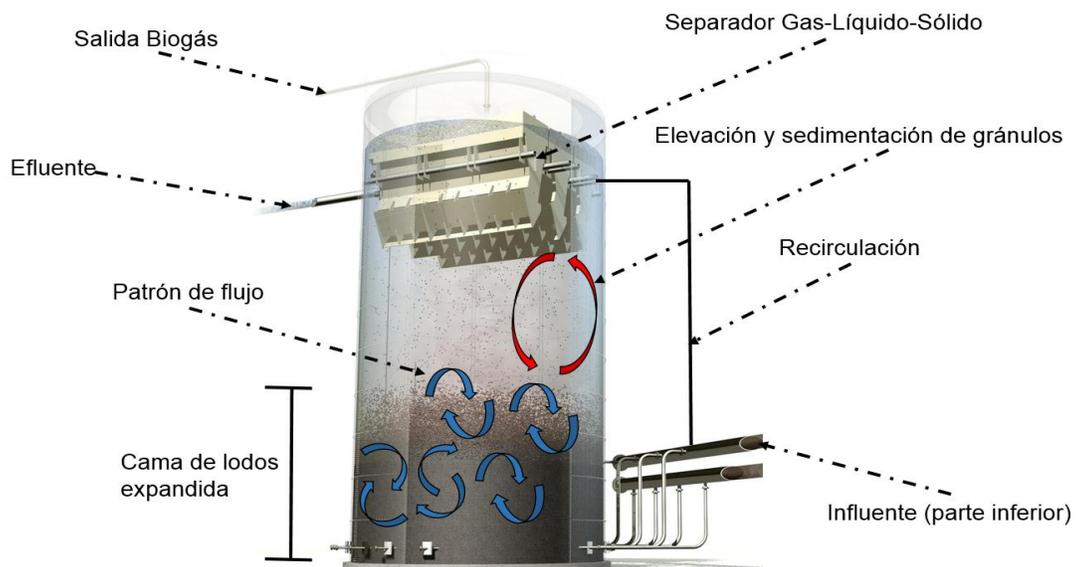


Figura

Las
Reactores
Los

Las

- Utilizan gránulos anaerobios como biomasa (en reactores a escala real concentraciones entre 20 a 40 kg·m⁻³)
 - El influente entra por la parte inferior del reactor, creando un patrón de flujo que permite la formación de gránulos
 - Sección de sedimentación para la biomasa y así evitar pérdidas
 - Separador Gas-Líquido-Sólido
- (C. Nicolella et al., 2000)



Figura

La velocidad ascensional es directamente proporcional a la suma del flujo de recirculación y al flujo de entrada, esta característica hace que la cama de lodos se expanda, por tanto existe mayor contacto entre cada gránulo y el agua residual; mejorando el transporte de masa y aumentando la eficiencia de degradación. Para procesos de digestión anaerobia se han reportado cargas hasta de 30 kg DQO m⁻³·d⁻¹ (Lim and Kim, 2014; Saleh y Mahmood, 2003).

Este

La velocidad ascensional está en función del flujo de recirculación más el flujo del influente y se relacionan como muestra la $V_s = \frac{\text{flujo}_{\text{recirculación}} + \text{flujo}_{\text{Influente}}}{\text{Área}_{\text{transversal}}}$ Ecuación

1:

$$V_s = \frac{\text{flujo}_{\text{recirculación}} + \text{flujo}_{\text{influyente}}}{\text{Área}_{\text{transversal}}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Dónde V_s es la velocidad ascensional, el *área transversal* se refiere al área tubular del reactor que atraviesa el flujo.

Geometría de los EGSB

Las relaciones geométricas en este tipo de reactores afectan la dispersión del fluido y el comportamiento en la expansión de la cama de lodos, paralelamente la eficiencia del tratamiento y la producción de hidrógeno.

Lee et al., (2006) estudiaron el efecto de la geometría en reactores que operan con biomasa granular, las relaciones altura/diámetro que estudiaron fueron 4, 8 y 12; la segunda obtuvo mejores rendimientos con un porcentaje de remoción del 97.8% operando con un TRH de 1 hora; en este estudio se observó que la relación geométrica de 12 genera zonas muertas y acumulación de biogás entre la biomasa, posiblemente la dinámica del fluido dentro del reactor es de tipo pistón. Es importante mencionar que la velocidad ascensional fue ajustada para cada geometría (V_s entre $0.057\text{-}1.32 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$) y obtener eficiencias de mezclado parecidas.

3.4.2. Gránulos anaerobios

Un gránulo es un agregado de origen microbiano de forma irregular parecido a una esfera, constituido por microorganismos, exopolímeros y metales, que ofrecen protección y soporte a la biomasa (Figura 7). Se forma por diversos fenómenos físicos, químicos, biológicos e hidrodinámicos como: la presión de selección dada por la tasa de dilución, segregación de proteínas y los patrones de flujo dados por los reactores UASB o EGSB, además pueden o no necesitar medio de soporte para formarse (carbón activado o polietileno, por ejemplo). Debido a estas propiedades pueden resistir compuestos tóxicos, concentraciones bajas de sustrato, cambios bruscos de pH y permiten concentraciones altas de biomasa en los procesos (Henze, 2008).

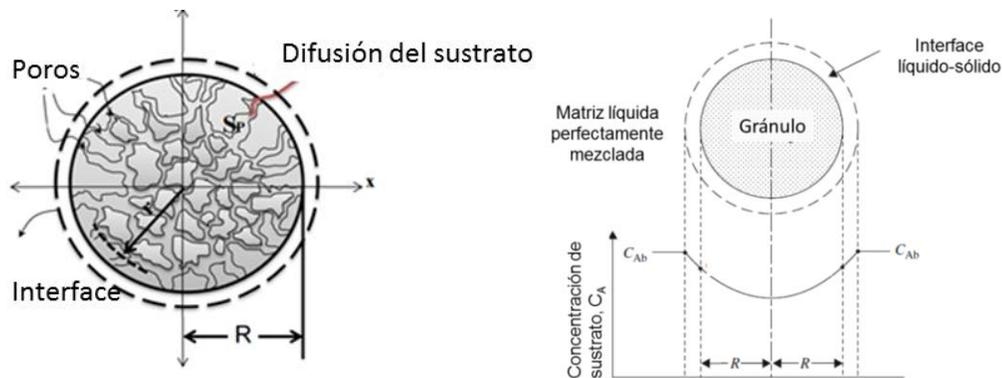


Figura 7. Los gránulos pueden ser considerados como superficies porosas catalíticas

3.4.3. Transferencia de masa

La eficiencia de todo proceso biotecnológico está gobernado por la actividad metabólica de los microorganismos y los fenómenos de transporte de masa en el reactor. Los reactores EGSB operan con fase líquida (agua residual), sólida (gránulos) y gaseosa (biohidrógeno), de tal forma que tanto los fenómenos de transporte e hidrodinámica son más complejos (Welty, 2008). El comportamiento hidrodinámico en reactores EGSB depende de: el tipo de agua residual suministrada (densidad, viscosidad y nutrientes), carga orgánica, velocidad ascensional, altura de la cama de lodos, geometría (altura/diámetro), producción de biogás, características granulares (diámetro, densidad, tipo de exopolímeros y velocidad de sedimentación) y la eficiencia del mezclado son algunos de los fenómenos y se presentan en la Figura 8; el desempeño de un biorreactor es evaluado por dos coeficientes globales de transferencia de masa para líquido-sólido (***k_c***) y líquido-gas (***k_{La}***) (Gonzalez-Gil et al., 2001; Peña et al., 2006). Los reactores que utilizan gránulos suelen desarrollar velocidades de reacción inferiores a las predichas por las cinéticas de reacción en cultivos suspendidos; se reporta que reactores que desempeñan valores de ***k_c*** por debajo de $0.0125 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ ó $0.3 \text{ m}\cdot\text{d}^{-1}$ están limitados en cuanto al transporte de masa externa líquido-sólido (Gonzalez-Gil et al., 2001; Stewart, 2003). El cálculo de ***k_{La}*** para reactores productores de hidrógeno ha sido más limitado, Pauss et al. (1990) obtuvo un ***k_{La}*** de 0.16 h^{-1} para la transferencia de hidrógeno en un reactor CSTR y 0.23 h^{-1} para un reactor UBFR (*upflow bed filter reactor*). Estos reactores contienen múltiples resistencias al transporte debido a la interacción Gas-Líquido-Sólido y se requiere el análisis del coeficiente general de transferencia de masa por convección², en este caso el transporte entre la matriz líquida y una partícula esférica porosa suspendida en un fluido (gránulo). Se considera que la reacción para la producción de hidrógeno se lleva a cabo sólo en los gránulos.

² El transporte por convección se refiere a la contribución del transporte por difusión y advección

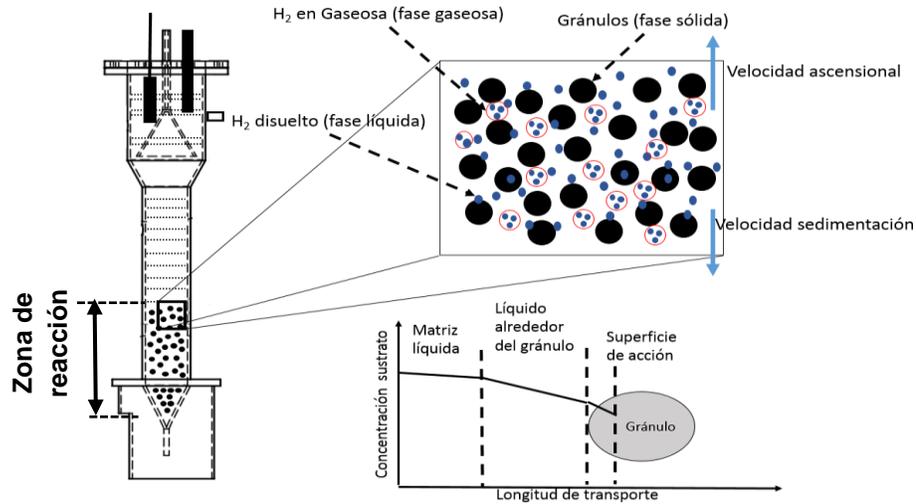


Figura 8. Esquema general de los fenómenos en un reactor EGSB

3.4.3.1. Transferencia de masa por convección

La ecuación que describe la transferencia de masa por convección es una analogía de la Ley del enfriamiento de Newton, como sigue:

$$N_A = k_c \cdot \Delta c_A \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde, N_A es el flux de la especie A, Δc_A es el gradiente de concentración entre la interface del sólido y la concentración promedio de la especie difundida en la corriente del fluido en movimiento y k_c es el coeficiente de transferencia de masa por convección (Welty, 2008).

El coeficiente k_c depende de las propiedades del líquido como la viscosidad, densidad y difusividad, al igual que la hidrodinámica del reactor. Debido a la dificultad de determinar k_c experimentalmente se utilizan correlaciones adimensionales como se muestran en la

Tabla 3, que bajo las condiciones establecidas pueden tener un error entre 10 y 20% (Doran, 2013; Moo-Young y Blanch, 1981).

Tabla 3. Relaciones adimensionales para la determinación de k_c

Número adimensional	Abreviatura	Fórmula	
Reynolds granular	Re_g	$Re_g = \frac{\rho_{aq} \cdot d_{ms} \cdot Vs}{\mu_{aq}}$	Ecuación 3
Schmidt	Sc	$Sc = \frac{\mu_{aq}}{\rho_{aq} \cdot D_c}$	Ecuación 4
Sherwood	Sh	$Sh = \frac{kc \cdot d_{ms}}{D_c}$	Ecuación 5

Donde, ρ_{aq} es la densidad del líquido, d_{ms} es el diámetro granular (corregido con el diámetro medio Sauter), Vs es la velocidad ascensional, μ_{aq} es la viscosidad del fluido, D_c es el coeficiente de difusión efectivo corregido por Stewart, (2003) y algunos D_c para algunos compuestos se muestran en la Tabla 4. El número de Sherwood representa la relación entre la velocidad general de transferencia y la velocidad de transferencia por difusividad a través de la intreface. El número de Schmidt es la relación de la difusividad del momentum³ y la difusividad de masa se determina por las propiedades físicas del sistema.

El número de Schmidt para lechos empacados y camas fluidizadas está en función de las propiedades del líquido y de la velocidad del flujo alrededor de partículas esféricas para un rango entre $10 < Re_g < 10^4$, por la ecuación 6:

$$Sh = 0.95 \cdot Re_g^{0.5} \cdot Sc^{0.33} \quad \text{Ecuación 6}$$

Las relaciones adimensionales varían dependiendo del proceso, condiciones (temperatura, presión, etc.) y regímenes de flujo caracterizado normalmente por el número de Reynolds.

Para este experimento, se estimaron los coeficientes generales de transferencia de masa líquido-sólido únicamente para los metabolitos que han sido medidos

³ La difusividad del momentum puede entenderse como la masa de un objeto multiplicado por su velocidad, en un enfoque de ingeniería ambiental es conveniente hablar del momentum por unidad de volumen (i.e. la densidad multiplicada por su velocidad). El momentum por unidad de volumen de agua que se mueve a velocidad U está dado por $\rho_w \cdot U$. De acuerdo con la ley de Newton el cambio en el momentum de un objeto es igual a la fuerza aplicada (Reible, 1998).

experimentalmente, los valores de difusividad en agua para los distintos metabolitos se observan en la Tabla 4.

Tabla 4. Coeficientes de difusión en agua a 25°C (Stewart, 2003)

Soluto	$D_{aq} (10^{-6}) \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$
Hidrógeno	45
Nitrógeno	18.8
Oxígeno	20
Dióxido De Carbono	19.2
Metano	14.9
Glucosa	6.7
Sacarosa	5.2
Lactosa	4.9
Ácido acético	12.1
Ácido propiónico	10.6
Ácido butírico	8.7

3.4.3.2. Transporte por difusión líquido-gas

Este tipo de transporte es evaluado mediante el coeficiente K_La , (Beckers et al., 2015; Pauss et al., 1990; Wu, 2013), que representa la transferencia de masa en dirección de gas a líquido y viceversa para todo el reactor, K_L podría llamarse el coeficiente de película y a es el área específica de la interface por unidad de volumen de líquido en el reactor (Pauss et al., 1990; Welty et al., 2007). La velocidad de transferencia de masa por difusión se describe proporcionalmente al gradiente de concentración (fuerza motriz) entre la fase líquida y la fase gaseosa, siendo el k_La (coeficiente volumétrico de transferencia de masa) la constante de proporcionalidad. El valor máximo del gradiente de concentración está limitado a la solubilidad de cada componente.

El k_La es afectado por los siguientes aspectos:

- 1) Intensidad de mezclado
- 2) Geometría del reactor
- 3) Velocidad de reacción
- 4) Potencial de transferencia de $P^{\circ}_G - C_s$ (relacionado con la presión parcial de H_2 y la concentración de H_2 en equilibrio).

El cálculo del k_La para sistemas anaerobios se basa en la retención del gas en la matriz líquida o Gas Holdup (ϵ_G). Nicolella et al. (2000) desarrollaron una función

dependientemente lineal que no es afectada por la carga de sólidos, densidad o tamaño de éstos, como sigue en la ecuación 7:

$$k_L a = (0.6 h^{-1}) \epsilon_G \quad \text{Ecuación 7}$$

Y ϵ_G se expresa de la siguiente manera (Buffière et al., 1998):

$$\epsilon_G = (13 \mp 1.2) dp^{0.168} * V_{sg(g)}^{0.7} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde dp es el coeficiente de diámetro de partícula de 0.168 propuesto por Begovich y Watson en (1978), V_{sg} es la velocidad ascensional generada debido al biogás; también debemos considerar el efecto que tiene sobre la agitación (Ren et al., 2009; Yang et al., 2015).

En una perspectiva general y tomando en cuenta los dos coeficientes mencionados anteriormente, podemos esquematizar los múltiples factores que implica el uso de gránulos para la fermentación oscura. Cómo es que afecta el pH y el estrés hidrodinámico a los gránulos, afectaciones en la estructura que hagan más lento o rápido el transporte de nutrientes.

Un esquema general de proceso está en la Figura 9 donde se muestran las múltiples resistencias que el sustrato debe vencer para llegar al sitio de reacción. En primer lugar consiste en transportarse hasta la interface líquido-sólido que se ubica alrededor del gránulo, de tal forma que la contribución entre la difusividad y la velocidad ascensional determinará su velocidad. Transportarse en la matriz granular constituida de exopolímeros, carbohidratos y biomasa hasta llegar al sitio de reacción que depende en gran medida del diámetro granular. Ya metabolizado el sustrato los metabolitos se transportan nuevamente hacia un nuevo sitio de reacción dentro del mismo gránulo u obedeciendo a la fuerza motriz y dirigirse debido a los gradientes de concentración. De tal forma que este sistema es multiresistencia ofrece un reto para aplicar un estrés hidrodinámico tal que permita el transporte sin afectar la estructura granular.

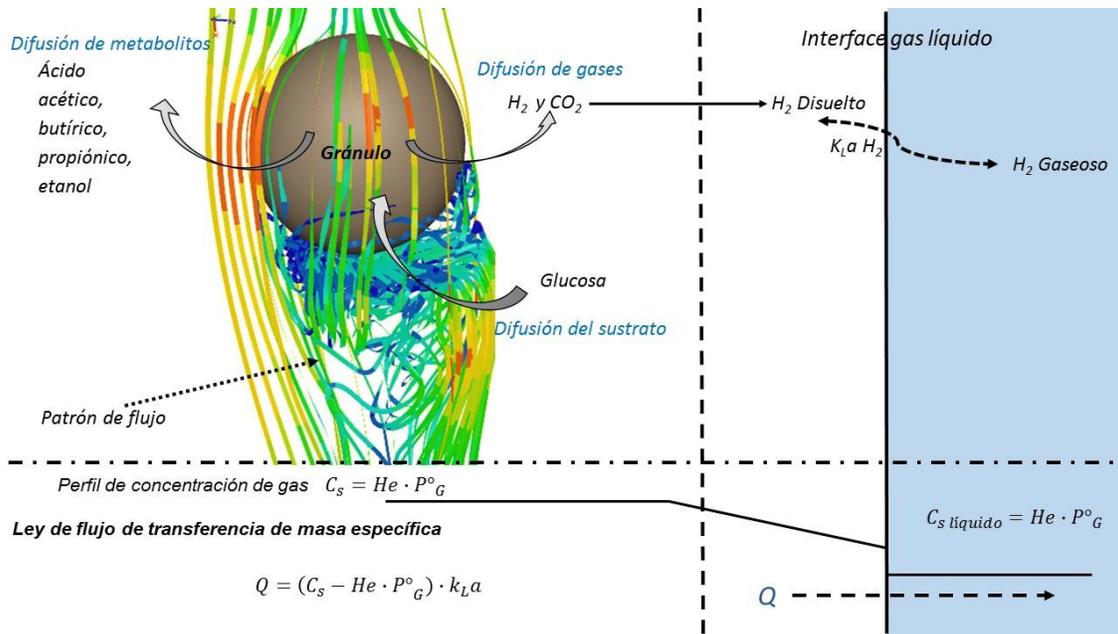


Figura 9. Esquema de los diversos fenómenos alrededor de un gránulo

3.4.4. Hidrodinámica del EGSB

Los reactores de tipo tubular son mezclados por recirculación del líquido que entra por la parte inferior del reactor y suelen aproximarse a flujos tipo pistón dependiendo de la velocidad ascensional, relación altura/diámetro del reactor (H/D), entre otros factores. La velocidad del líquido en el reactor se distribuye y decrece en función de la altura (Figura 10).

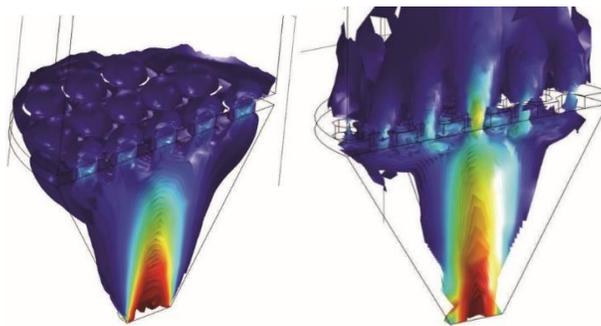


Figura 10. Distribución del influente en el fondo del reactor, los colores representan la velocidad (Yang et al., 2015)

3.4.4.1. Dispersión del fluido en el reactor

El comportamiento del fluido en el reactor generado por la intensidad de mezclado es caracterizado por el número de Pe_{axial} que está en función del coeficiente de dispersión axial, es decir el grado de retromezcla en el reactor (Iborra y Tejero, 2010; Levenspiel, 2002) y se estima de la siguiente manera (ecuación 9):

$$Pe_{axial} = \frac{V_s \cdot h}{D_A} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde V_s es la velocidad ascensional, h es la altura del reactor y D_A es el coeficiente de dispersión axial. Cuando el D_A es mínimo $Pe \rightarrow \infty$, esto quiere decir flujo tipo pistón, por otro lado cuando la dispersión axial es máxima Pe tiende a cero, por lo que el mezclado puede considerarse como completo (Guo, 2002). El D_A se describe con la siguiente expresión (ecuación 10):

$$D_A = 1.03V_s^{1.11} * 0.009^{n_j} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde, n_j es el valor de la altura normalizada del reactor, $n_j = z/h$, donde z es la posición axial (punto de estimación) y h es la altura del reactor (Zeng et al., 2005). Eficiencias de remoción superiores al 90% en reactores UASB desarrollan condiciones como: $1.4 < Pe_{axial} < 5.1$ (Peña et al., 2006).

3.4.4.2. Turbulencia del reactor

La turbulencia generada en el reactor se caracteriza por el número de Reynolds, dada la siguiente expresión:

$$Re = \frac{v_s \cdot d_{reactor}}{\nu} \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde, V_s es la velocidad ascensional, $d_{reactor}$ es el diámetro del reactor en la zona de elevación y ν es la viscosidad cinemática ($0.8 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}$). Los rangos de regímenes de operación son (Welty, 2008):

- Laminar- $Re < 2300$
- Transitorio- $2300 < Re < 4000$
- Turbulento- $Re > 4000$

3.4.4.3. Velocidad de sedimentación en gránulos

La sedimentabilidad granular determina la robustez de la biomasa a soportar el estrés hidrodinámico, manteniendo su integridad y densidad para evitar el lavado. De esta manera también se ha considerado como parámetro de operación para precisar viabilidad granular y estimar las cargas orgánicas de operación. La velocidad de sedimentación calculada se basa en la Ley de Stokes para partículas esféricas en regímenes de flujo laminares, basado en la caída vertical de la partícula (gránulo) debida a su peso, donde la fuerza de fricción se iguala con el peso

aparente del gránulo (Waid, 1995). La corrección de la Ley de Stokes es mediante la Ley de Allen y se obtiene (Ecuación 12):

$$U_t = 0.781 \left[\frac{d_{ms}^{1.6} (\rho_g - \rho_L)}{\rho_L^{0.4} \cdot \mu_L^{0.6}} \right]^{0.714} \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde, U_t ($m \cdot h^{-1}$) es la velocidad de sedimentación, d_{ms} (m) es el diámetro Sauter granular, ρ_g es la densidad granular ($kg \cdot m^{-3}$), ρ_L es la densidad del lactosuero ($kg \cdot m^{-3}$) y μ_L es la viscosidad del lactosuero ($Pa \cdot s$). Las densidades fueron medidas experimentalmente y la viscosidad del lactosuero calculada ($0.725 \times 10^{-3} Pa \cdot s$) mediante monogramas (Fernández-Martín, 1984).

3.4.4.4. Velocidad de corte en gránulos

Para calcular la velocidad de corte (γ) Wu et al. (2012a) encontraron una ecuación para calcular el esfuerzo cortante en función del número de Reynolds (alrededor del gránulo) como sigue:

$$\gamma = 3.52 Re_g + 1.889 \quad \text{Ecuación 13}$$

$$Re_g = \frac{\rho \cdot d_{ms} \cdot V_s}{\mu} \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde γ es la velocidad de corte promedio en s^{-1} , Re_g es el número de Reynolds alrededor del gránulo (adimensional), μ es la viscosidad dinámica ($Pa \cdot s$), ρ es la densidad del fluido ($kg \cdot m^{-3}$), d_{ms} es el diámetro medio Sauter granular (m) y V_s es la velocidad ascensional ($m \cdot h^{-1}$).

3.4.5. Sistema integral para el tratamiento de aguas residuales y producción de energía

El principio básico de sistemas acoplados es la recuperación de energía mediante distintos sistemas que funcionen coordinadamente, en una primera fase la fermentación de carbohidratos y producción de hidrógeno y ácidos grasos volátiles; en una segunda etapa aprovechar los ácidos grasos en otro bioproceso como las celdas electroquímicas, fotofermentación, metanogénesis o celdas de combustible microbianas (Figura 11). El arreglo de los diferentes sistemas recuperaría de forma teórica los 12 mol de $H_2 \cdot mol$ de glucosa $^{-1}$ (Hallenbeck and Ghosh, 2009).

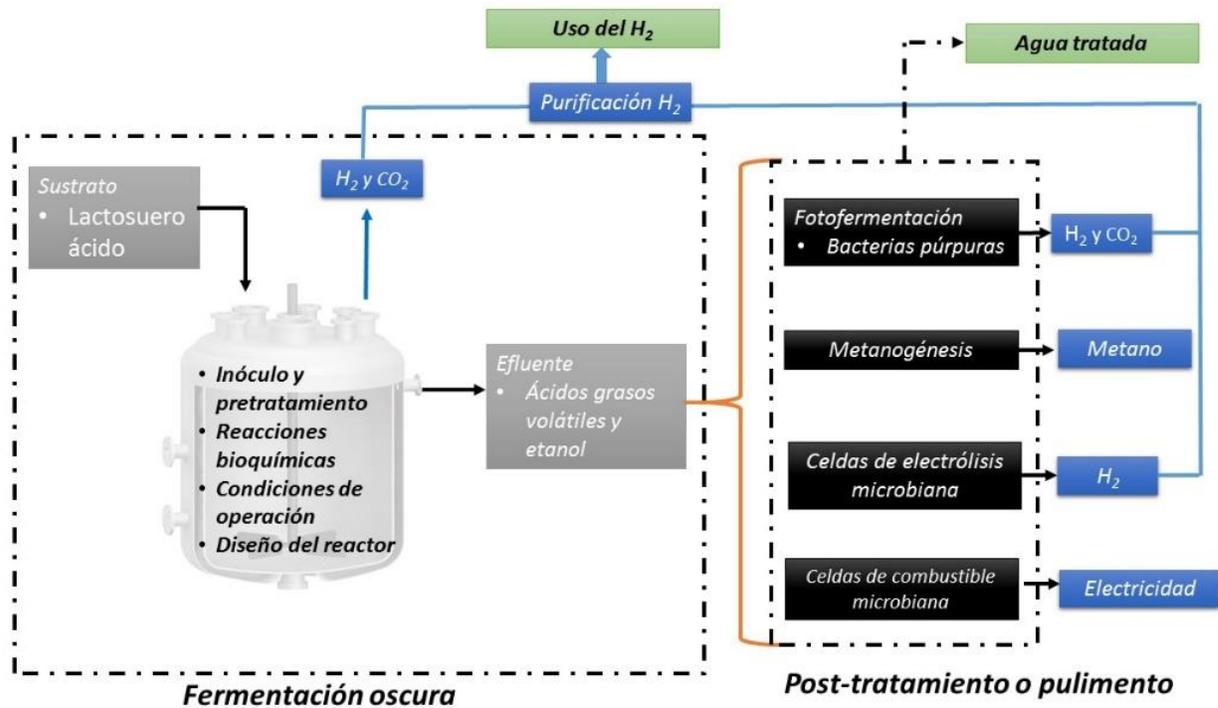


Figura 11. Concepto de biorrefinería integral biohidrógeno (Show et al., 2012)

Nos encontramos con muchos retos para que esto pueda llevarse a cabo, si se quiere acoplar la fermentación oscura y un proceso posterior, requerimos:

- Cantidad y proporción de biohidrógeno estable
- La producción de metabolitos estable en cuanto a cantidad y tipo de metabolito (rutas de degradación y producción de BioH₂)

4. Efecto del estrés hidrodinámico en un reactor EGSB para la producción de hidrógeno usando lodo granular metanogénico

4.1. Introducción

La supresión o disminución la producción de metano en gránulos anaerobios metanogénicos para la producción de hidrógeno ya ha sido estudiada por distintos métodos. El uso de gránulos permite: desacoplar el tiempo de retención de sólidos (TRS) del tiempo de retención hidráulico (TRH), mayor concentración de biomasa, mayor separación de biomasa del agua residual y la consecuente estabilidad al tratamiento de aguas residuales en cuanto a su actividad. *Abreu et al., (2011)* estudió el efecto que tienen los pretratamientos térmico y químico (en la estructura granular y la producción de hidrógeno en reactores EGSB suministrando agua residual sintética con glucosa y L-arabinosa como fuente de carbono ($5\text{g DQO}\cdot\text{L}^{-1}$) a 37°C , donde también se evaluaron dos TRH a 20 y 12 horas. El pretratamiento térmico consistió en hervir el lodo por 15 minutos a 100°C ; los resultados fueron productividades por debajo de los $300\text{ mLH}_2\cdot\text{L}_{\text{reactor}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ en ambos TRH y no hubo disgregación granular. Los dos pretratamientos con químicos fueron con 2 bromoetano sulfonato (BESA) y BESA mezclado con cloroformo. La productividad de bioH_2 en el experimento suministrando BESA fue muy variable para el primer TRH con picos de producción de hasta de 0 a $1500\text{ mLH}_2\cdot\text{L}_{\text{reactor}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, mientras que para el TRH de 12 horas se alcanzó una productividad de $700\text{ mLH}_2\cdot\text{L}_{\text{reactor}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ sin afectaciones significantes en la estructura granular. Para la mezcla entre BESA y cloroformo la producción estuvo por debajo de los $300\text{ mLH}_2\cdot\text{L}_{\text{reactor}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ en ambos TRH, además que los gránulos se disgregaron. Se detectaron picos de producción en respuesta al suministro de pulsos de la mezcla química (no mayores a $300\text{ mLH}_2\cdot\text{L}_{\text{reactor}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Todos los experimentos desarrollaron productividades y rendimientos bajos.

Los pretratamientos mencionados no podrían ser aplicados a escala real por costos de operación y dificultad en la operación, ya que se reporta la detección de metano en periodos largos de operación (*Azbar et al., 2009; Carrillo-Reyes et al., 2012; Castelló et al., 2009; Yang et al., 2007*).

La operación del biorreactor debe permitir la inhibición de la producción de metano al inicio y durante la operación. La manipulación del TRH para la producción de hidrógeno (*Ueno et al., 1996; Zhang et al., 2006*) y pH (*Wang et al., 2006; Zhou y Nanqi, 2007*) sentaron las bases para la aclimatación y operación de reactores con gránulos. *Hernández-Mendoza y Buitrón (2014)* aclimataron lodo granular en condiciones ácidas (pH 4.5) y TRH corto (5.5 h); inhibiendo la actividad metanogénica en 14 días.

Por otro lado, el aumento en la intensidad de mezclado en reactores granulares mejora los fenómenos de transporte de masa (*Brito and Melo, 1999*) aumentando la turbulencia y el estrés hidrodinámico del reactor y alrededor de los gránulos (*dos Reis y Silva, 2011; Wu et al., 2012a*). El estrés hidrodinámico es provocado de forma sinérgica por el TRH y la velocidad ascensional (*Liu and Tay, 2002*), también puede ser manipulado para controlar la capacidad de granulación, espesor de la biopelícula que en este caso es el radio granular y establecer puntos críticos de operación (lavado de gránulos). El aumento del estrés provoca mayor cantidad de colisiones entre gránulos y pérdida de biomasa en la estructura (*Wu et al., 2012a*).

El objetivo de este capítulo es estudiar el efecto del estrés hidrodinámico sobre la inhibición de la producción metano a partir de un lodo granular metanogénico suministrando agua residual sintética con glucosa como fuente de carbono. Se evaluaron la composición de metano e hidrógeno, tipo de metabolitos y las características granulares como diámetro, densidad y velocidad de sedimentación.

También se estimaron de forma teórica el comportamiento del reactor en cuanto al número de Reynolds, número de Peclet axial, coeficiente k_c y kLa .

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Diseño y construcción de un Reactor EGSB

El reactor EGSB fue construido de acrílico transparente (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Está constituido por una primera sección que mide 6.4 cm de diámetro, una zona de sedimentación de diámetro de 10.4 cm, y un separador de tres fases para evitar salida de biomasa. La altura total del reactor fue de 57 cm, el volumen de trabajo fue de 1.85 litros. El fondo del reactor fue cónico para distribuir el flujo uniformemente. La relación altura/diámetro fue 9.

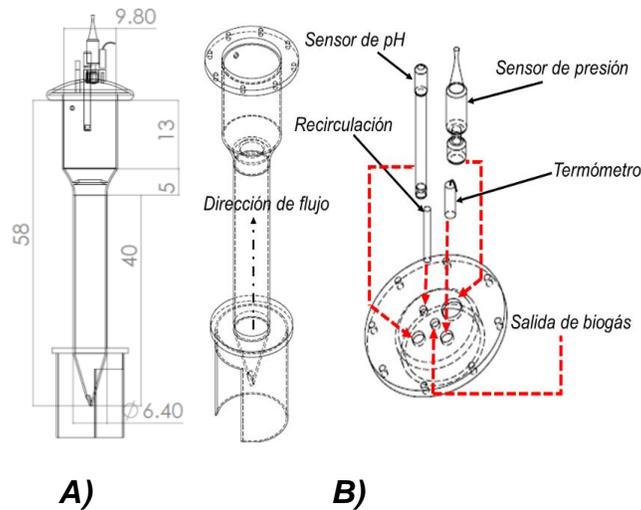


Figura 12. Medidas del biorreactor EGSB (cm), B) Vista explosionada de los componentes del EGSB

Para mantener la temperatura a 35°C se usó una cinta térmica acoplada a un controlador de temperatura (Thermo Scientific, USA). Se utilizaron bombas peristálticas (Masterflex, Easy-Load) para el influente, recirculación y álcali. El pH se mantuvo a 4.5 usando un controlador de pH (pH controller, Hanna Instruments, USA), suministrando NaOH 1.5 N (Figura 13). La velocidad ascensional fue controlada mediante el flujo de recirculación del medio del reactor de la parte superior y reingresada por la parte inferior del reactor.

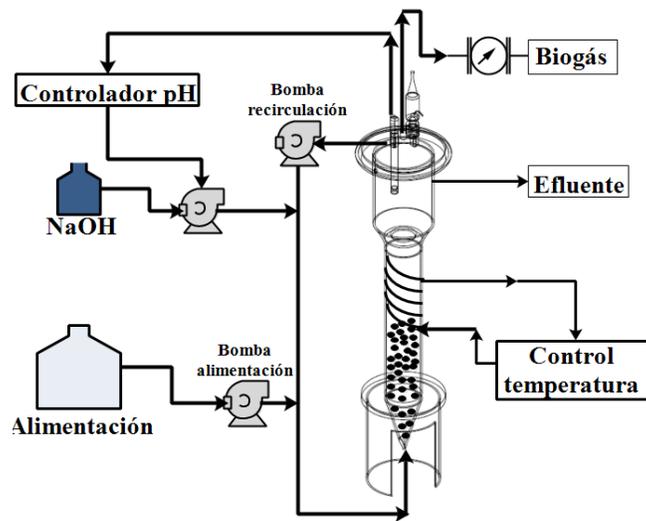


Figura 13. Esquema de operación EGSB

4.2.2. Sustrato e inóculo

Se utilizó agua residual sintética para la aclimatación, manteniendo una relación 100/6.8/2.8 (carbono/nitrógeno/fósforo). Se utilizó glucosa como fuente de carbono,

cloruro de amonio para nitrógeno y fosfato de potasio dibásico para fósforo; la composición es la siguiente dada en g/L: K_2HPO_4 , 0.0723; NH_4Cl , 0.1191; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.0025; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.125; KI , 0.0025; $FeSO_4 \cdot H_2O$, 0.005; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.0045; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.0005; H_3BO_3 , 0.0005; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.0005; $ZnCl_2$, 0.0005. El inóculo fue lodo granular metanogénico obtenido de un reactor UASB escala real para el tratamiento de aguas residuales de la industria cervecera.

4.2.3. Estrategia experimental

El TRH del EGSB fue de 4.5 horas, pH de 4.5, la concentración inicial de lodo anaerobio granular fue de $7.3 \text{ gSV} \cdot \text{L}^{-1}$ y sin purga de lodos. La velocidad de carga orgánica aplicada fue de $7 \text{ kg-glucosa} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. El estrés hidrodinámico fue por la variación en la velocidad ascensional: 0.3, 2, 3 y $5 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$.

4.2.4. Técnicas analíticas

4.2.4.1. *Composición del gas.* La composición del biogás producido (hidrógeno, metano y dióxido de carbono) se determinó con un cromatógrafo de gases (SRI 8610C) acoplado a un detector de conductividad térmica y dos columnas empacadas de acero inoxidable (6' x 1/8 gel x 6' 1/8" corte molecular 13X). La temperatura del inyector y del detector fue de 90°C y 150°C , respectivamente. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador a 50 psi de presión.

4.2.4.2. *Producción de biogás.* Para medir la producción de biogás se utilizó un medidor de flujo Ritter tipo MGC-1 V3.1 PMMA.

4.2.4.3. *Cuantificación de ácidos grasos volátiles.* La cuantificación de ácidos grasos volátiles se realizó en un cromatógrafo de gases (Varian 3300) acoplado a una detector de ionización de flama y una columna capilar (longitud 15m, diámetro interno 0.53 mm, Zebron ZB-FFBAP, Phenomenex). La temperatura de inyector y del detector se mantuvo a 190°C y 210°C . Se usó nitrógeno como fase móvil. Se analizaron ácido acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico y etanol.

4.2.4.4. *Cuantificación de carbohidratos totales.* Se realizó siguiendo el método fenol-sulfúrico utilizando glucosa como referencia (Dubois et al., 1956).

4.2.4.5. *Granulometría.* Se fotografiaron los gránulos y midió su diámetro por análisis de imágenes usando un estereoscopio (Carl Zeiss, Germany) software Axio Vision LE.

4.3. Resultados

La variable de respuesta más importante para observar el desempeño de la inhibición metanogénica es la composición del biogás, se logró que el metano fuera indetectable hasta la segunda condición ($5 \text{ m} \cdot \text{h}^{-1}$) (Figura 14). Por lo tanto cuando la proporción de metano disminuye, la del hidrógeno aumenta, lo que es reflejado

en la productividad de cada condición. Se observó que cuando la velocidad ascensional fue de $5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ el promedio de productividad fue de $1.62 \text{ LH}_2 \text{ L}_{\text{reactor}}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Sin embargo, se observó que la productividad disminuyó a 67 y 71% cuando la velocidad ascensional fue 2 y $3 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente.

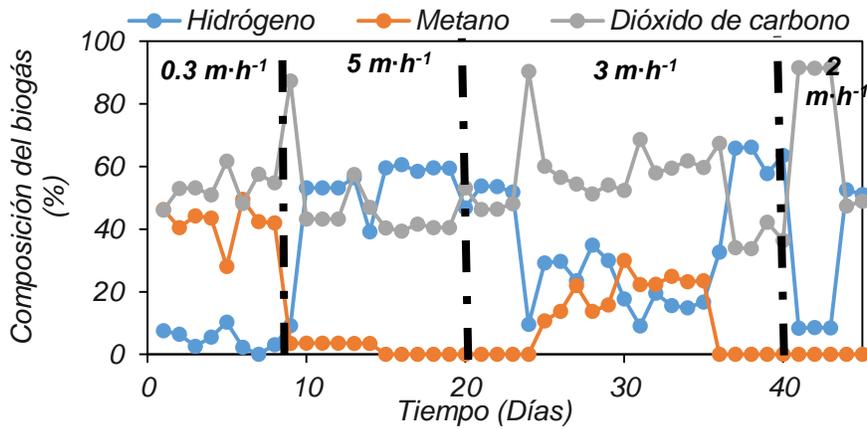


Figura 14. Evolución de la composición del biogás

En la Figura 15 se observa el efecto de la velocidad ascensional sobre la productividad promedio y rendimiento por condición, la mayor productividad y el máximo rendimiento fueron $1.8 \text{ LH}_2 \text{ L}_{\text{reactor}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y 1.8 moles de $\text{H}_2\cdot\text{mol}$ glucosa⁻¹, respectivamente obtenidos a una Vs de $5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$.

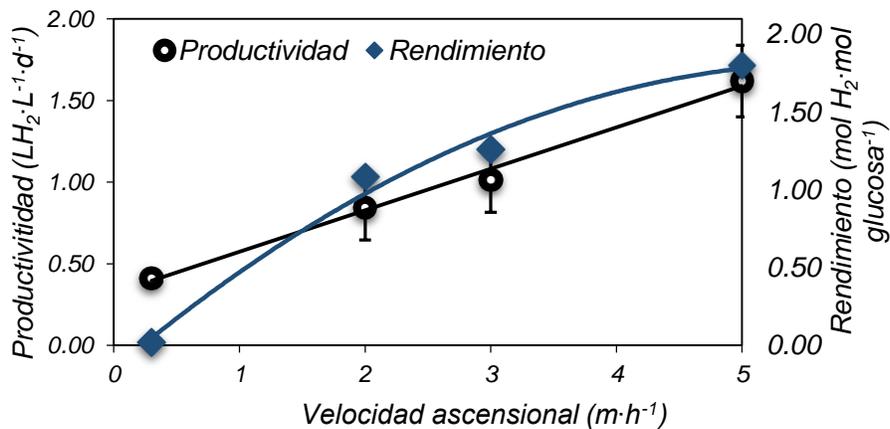


Figura 15. Efecto de la velocidad ascensional sobre la productividad y el rendimiento

Se ha reportado el efecto que tiene el aumento de la velocidad ascensional sobre la degradación de materia orgánica y producción de biogás (Brito y Melo, 1999). El aumento en la velocidad ascensional genera mayor turbulencia, el grado de retromezcla y disminuye la dispersión axial en el reactor. Esto se ve también con la

Figura 16, el número de Reynolds (Re) es proporcional a V_s pero el Número de Peclet axial (Pe_{axial}) es inversamente proporcional. El grado de expansión máximo en el biorreactor fue de aproximadamente 70% en volumen cuando la velocidad ascensional fue de $5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$. Las velocidades $0.3, 2, 3$ y $5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ generaron Re de $6, 40, 60$ y 100 , respectivamente; todos están en el rango de flujo laminar.

El mezclado por recirculación en reactores tubulares como los EGSB no será completo o perfecto como los CSTR, pero dependiendo de la velocidad ascensional pueden aproximarse en mayor o menor medida a un mezclado completo; para que el mezclado en un reactor de tipo tubular se comporte más a un CSTR los valores de Pe_{axial} deben ser menores a 50 , este valor se aplica a reactores que usan lechos empacados o en otras palabras los números de $Pe_{axial} > 50$ describen un comportamiento más próximo a un flujo de tipo pistón. Las velocidades $0.3, 2, 3$ y $5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ generaron valores de Pe_{axial} : $65.3, 53, 50.7$ y 47.9 , respectivamente. Esto indica que el reactor EGSB a una V_s de $5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ podría considerarse un CSTR. De acuerdo con (Davis y Davis, 2003), todos los reactores tubulares desempeñan algún grado de dispersión axial (laboratorio y escala real), pero el valor de Pe_{axial} determinará el grado

En el caso de un EGSB productor de hidrógeno, cuanto más cercano sea a un CSTR las probabilidades de una producción estable serán mayores, debido a la disponibilidad de nutrientes y transferencia de masa.

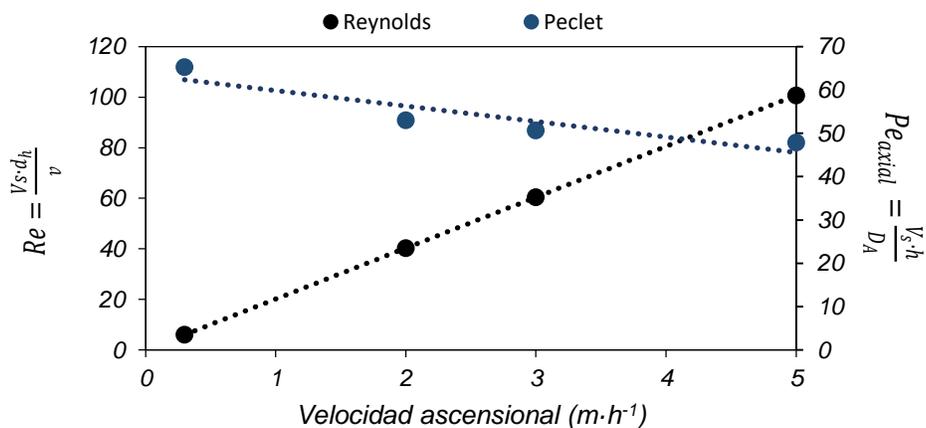


Figura 16. Comportamiento del Número de Reynolds y Peclet en función de la velocidad ascensional

Se observó una relación directamente proporcional entre la V_s y el número de Reynolds; sin embargo ésta relación fue inversamente proporcional con el número de Peclet como se observa en la Figura 17.

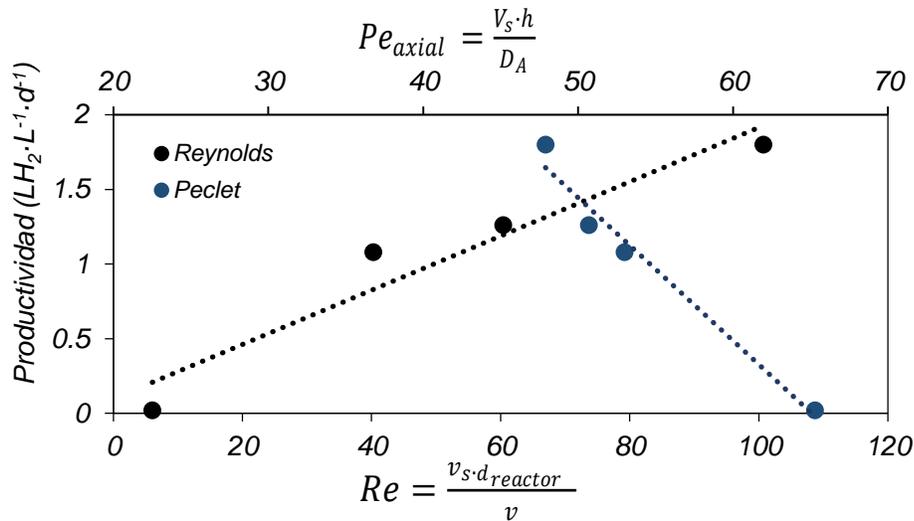


Figura 17. Comportamiento de la productividad en función del Número de Reynolds (Eje x inferior) y Peclet (Eje x superior)

Las Figuras 14 y 15 muestran el comportamiento de la turbulencia y dispersión generada en el reactor por las diferentes velocidades ascensionales. Sin embargo, para estimar el estrés hidrodinámico aplicado en los gránulos se calcula la velocidad de corte (γ) en s^{-1} , como lo reporta *Wu et al.*, (2012b); éste parámetro está en función del número de Reynolds alrededor del gránulo⁴ (Re_g) como se muestra en la Figura 18. Las velocidades ascensionales 0.3, 2, 3 y 5 $m \cdot h^{-1}$ produjeron γ de 2.9, 11.2, 18.9 y 38.6 s^{-1} , respectivamente. Se reporta que la disgregación granular puede ocurrir en valores de velocidad de corte (γ) entre 20-30 s^{-1} (*Wu et al.*, 2012b).

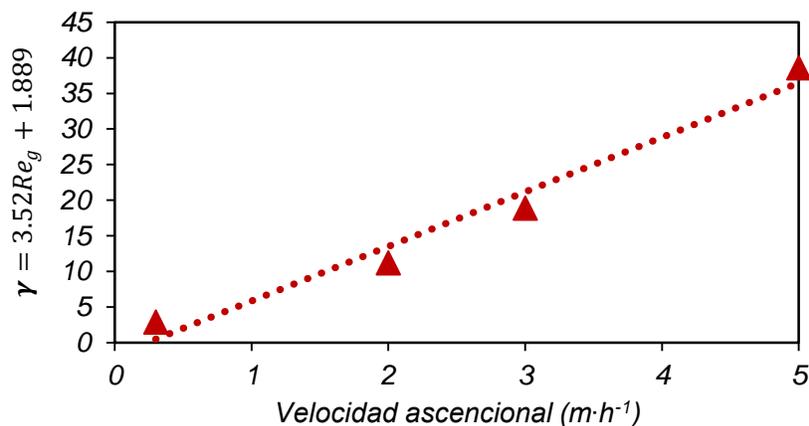


Figura 18. Relación entre la velocidad ascensional y la velocidad de corte (γ)

⁴ Debe diferenciarse entre Re que es el número de Reynolds generado en el reactor y Re_g que es el número de Reynolds generado alrededor del gránulo.

Se observa en la Figura 19 el efecto que tiene el estrés hidrodinámico aplicado en la eficiencia de degradación de glucosa, las velocidades de corte: 2.9, 11.2, 18.9 y 38.6 s^{-1} los siguientes remociones en porcentaje 99.5, 88.6, 96.6 y 94.7, respectivamente. En la velocidad de corte de 11.32 s^{-1} la degradación cayó hasta un 88% y posiblemente debido a la inestabilidad del proceso, se observa que alcanzó su estabilidad en cuanto a proporción de hidrógeno, pero el metabolismo de consumo pudo no ser igualmente alcanzado en este tiempo que fueron 5 días.

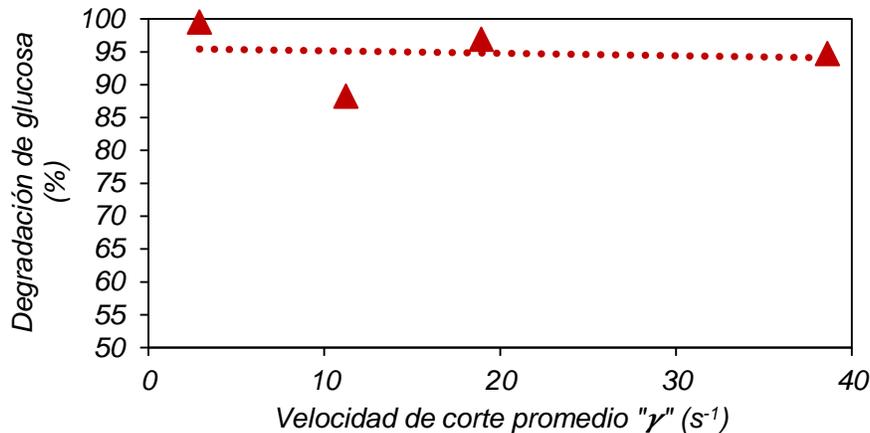


Figura 19. Efecto de la velocidad de corte sobre la eficiencia de degradación de glucosa

Por otro lado, la evolución del diámetro granular a través del tiempo se muestra en la Figura 20, los diámetros inicial y final de la experimentación fueron de 1.98 y 0.95 mm, respectivamente. El diámetro granular se redujo 52% en 45 días de operación. Se ha reportado *Hernández-Mendoza y Buitrón, (2014)* reportaron la reducción del 30% en el diámetro granular en 66 días de operación esto durante la aclimatación de lodo aplicando una velocidad ascensional de 2 $m \cdot h^{-1}$ suministrando glucosa como fuente de carbono.

El estrés hidrodinámico es generado principalmente por el flujo de la recirculación, cuanto mayor sea el estrés mayor será el desgaste en los gránulos debido a fricción tangencial por la fuerza del agua, deformándolo y creando gradientes de velocidad alrededor del gránulo. Además, aumenta la cantidad de colisiones entre los gránulos de tal forma que todos estos fenómenos contribuyen a la disminución del diámetro granular. La corrección del diámetro granular se hizo mediante el diámetro medio Sauter.

Una solución ante el alto estrés hidrodinámico aplicado sobre los gránulos y su probable lavado del reactor sería modificar la velocidad ascensional en función del diámetro o velocidad de sedimentación granular durante el proceso, de tal forma

que la reducción en el tamaño de gránulo podría brindar ventajas en cuanto a disminuir la velocidad ascensional pero manteniendo un coeficiente de transferencia tal que no limite a la producción de hidrógeno, como posteriormente se calcula en esta investigación mediante el coeficiente **kc**.

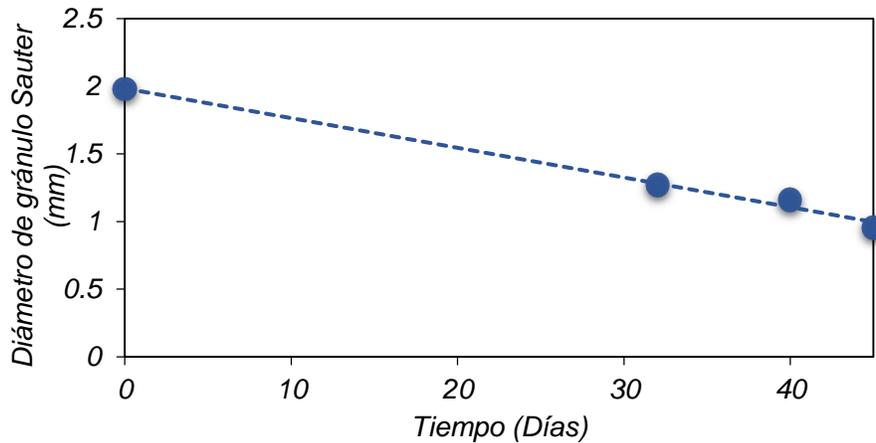


Figura 20. Evolución del diámetro granular (Sauter) en el tiempo

Se observó que el estrés hidrodinámico tuvo una influencia negativa en la velocidad de sedimentación, pues la sedimentación depende principalmente del diámetro granular. Las velocidades de sedimentación al inicio y al final de la experimentación fueron de 88.4 y 38.4 m·h⁻¹, respectivamente y representa una disminución del 56%, como muestra la Figura 21.

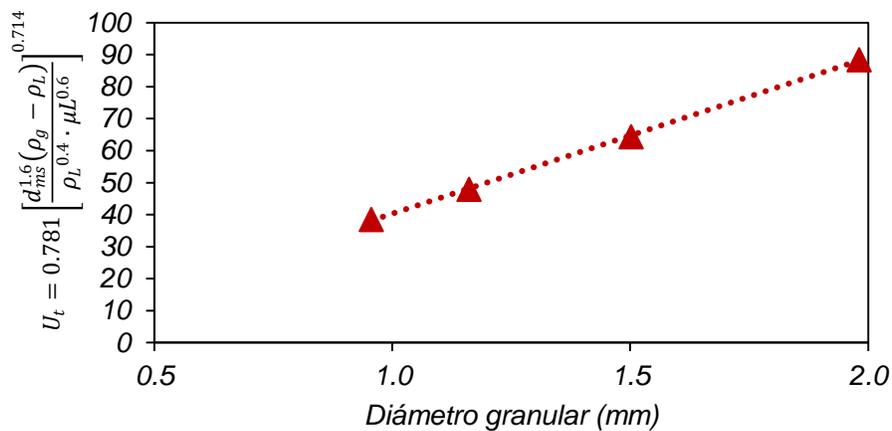


Figura 21. Influencia del diámetro granular sobre la velocidad de sedimentación

El color de los gránulos era negro completamente al inicio de la experimentación como se observa en (A) de la Figura 22. Mientras que el color al final del

experimento era mayormente café como se ve en (C) de la Figura 22. El cambio de color es gradual y puede ser debido al lavado celular de las capas externas del gránulo, que están compuestas por bacterias sulfato-reductoras de color negro (Fang et al., 2002).

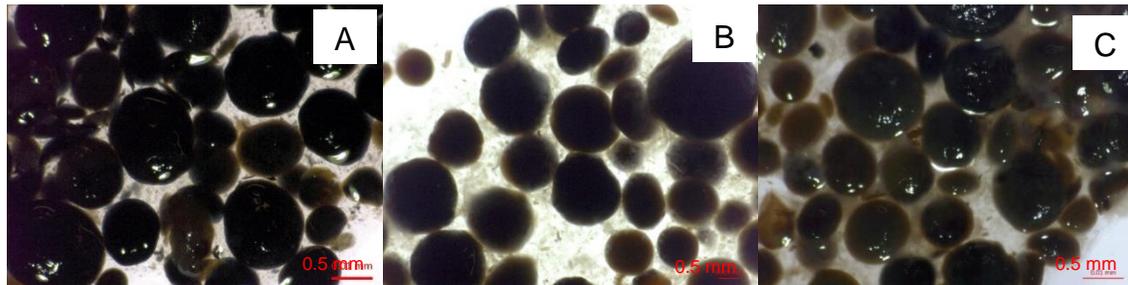


Figura 22. Microfotografías de gránulos anaerobios A) Biomasa inicial, B) 35 y D) 45 días de operación

En la Figura 23 se observa que conforme aumenta la velocidad superficial disminuye la proporción de ácido butírico que va de 44 a indetectable, de forma parecida el porcentaje molar del ácido acético disminuye conforme el estrés es mayor, de 49.1 a 26.3%. De forma contraria, el etanol tuvo tendencia a incrementar conforme el estrés aumentaba, de ser indetectable a 70% del total de los metabolitos en la condición de mayor estrés cuando la velocidad era $5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$. La variación en la generación del tipo de metabolitos puede estar influenciada por la diferencia de la velocidad de síntesis de etanol y los demás ácidos orgánicos, presión parcial y concentración de H_2 disuelto en el medio que hagan cambiar la ruta metabólica. Por ejemplo, las *enterobacterias* fermentativas producen hidrógeno derivado del formiato, durante esta fermentación la glucólisis se produce NADH que debe ser oxidado nuevamente mediante la producción de etanol pero a pH más ácido la ruta puede cambiar a solventogénesis (Hallenbeck, 2009).

También es importante mencionar que cuando más ácido es el medio en la fermentación oscura, la energía libre Gibbs aumenta (reacciones menos favorables) aunque también influyen el tipo de metabolitos. Dentro de las combinaciones de metabolitos, la producción de acetato y etanol es la más favorable por tener la menor energía de Gibbs, mientras que la ruta que sólo produce acetato sería la menos favorable como se observa en la Figura 1, por lo que la ruta a la que se dirigieron los gránulos fue la más favorable energéticamente, aunque se debe tomar en cuenta que esta ruta (etanol/acetato) se limita a $2 \text{ ml}\cdot\text{H}_2 \text{ mol glucosa}^{-1}$.

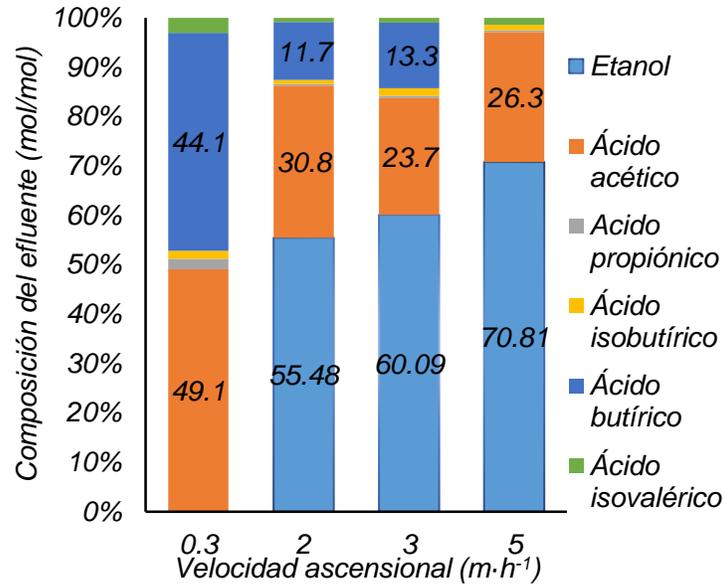


Figura 23. Comportamiento de ácidos orgánicos en porcentaje molar

La Figura 24 muestra la relación etanol/acético que son los metabolitos predominantes, ésta relación aumenta proporcionalmente a la productividad de hidrógeno, con un valor máximo de 2.69, que representa el 96% del total de los metabolitos medidos. De forma contraria, fue la tendencia que reporta Lamed et al., (1988) en un experimento dirigido a la producción de hidrógeno y etanol a partir de celulosa y celobiosa con cultivos de *Clostridium*. Cuanto mayor fue la producción de hidrógeno mayor fue la relación etanol/acético. Mientras que Guo et al., (2008b) obtuvo la mejor productividad de hidrógeno cuando el porcentaje molar de etanol+acético fue del 89%.

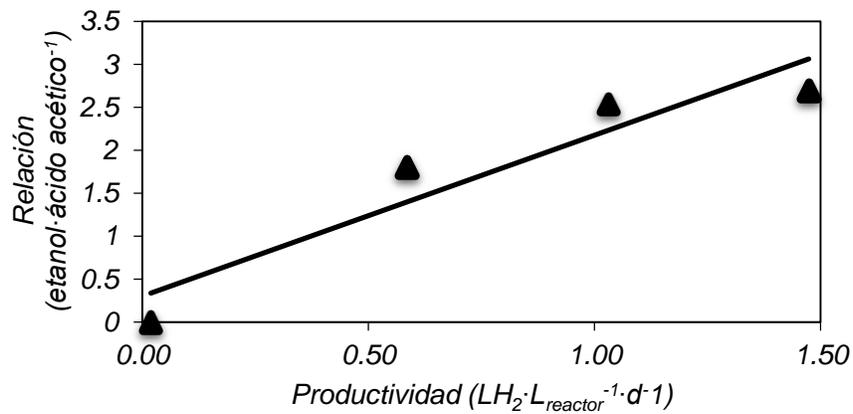


Figura 24. Producción de metabolitos en función de la productividad de BioH₂

La Figura 25 muestra el comportamiento del coeficiente global de transferencia kc que es proporcional a la velocidad de corte (γ), puesto que γ está en función de la velocidad ascensional y el diámetro granular. Debe señalarse que kc también es directamente proporcional al coeficiente de difusión de cada compuesto existente en el agua; el compuesto con el menor D_c es la glucosa y por tanto el compuesto limitante para el transporte. Los valores de kc para glucosa en función de γ son: 0.004, 0.016, 0.014 y 0.055 $m \cdot h^{-1}$. El valor de 0.004 pertenece a una γ de 2.9 s^{-1} para la velocidad ascensional de 0.3 $m \cdot h^{-1}$, es la única condición que teóricamente presenta limitaciones en la transferencia y donde se obtuvo metano. De acuerdo con *González-Gil et al., 2001* los valores de kc por debajo de 0.0125 $m \cdot h^{-1}$ presentan limitaciones en transferencia de masa líquido-sólido. Se puede inferir que la inhibición de la actividad metanogénica no pudo completarse en la primera etapa ($V_s = 0.3 m \cdot h^{-1}$), los valores de kc sugieren que podría deberse a limitaciones en el transporte de masa para la producción de hidrógeno por fermentación oscura. Los valores de kc son inversamente proporcionales al número de $Peclet_{axial}$ como se muestra en la Figura 26. Sin embargo el consumo de glucosa fue menor en la velocidad de corte de 11.3 s^{-1} pero el coeficiente de transporte indica que no hubo limitaciones y esto podrían deberse a los cambios en la ruta metabólica, en esta condición los metabolitos son etanol, ácido acético y ácido butírico; mientras que la condición de 38 s^{-1} sólo tuvo etanol y ácido acético. La partición de la misma cantidad de sustrato suministrado dividida en tres metabolitos y posiblemente diferentes velocidades de reacción pueden contribuir a la disminución en el degradación.

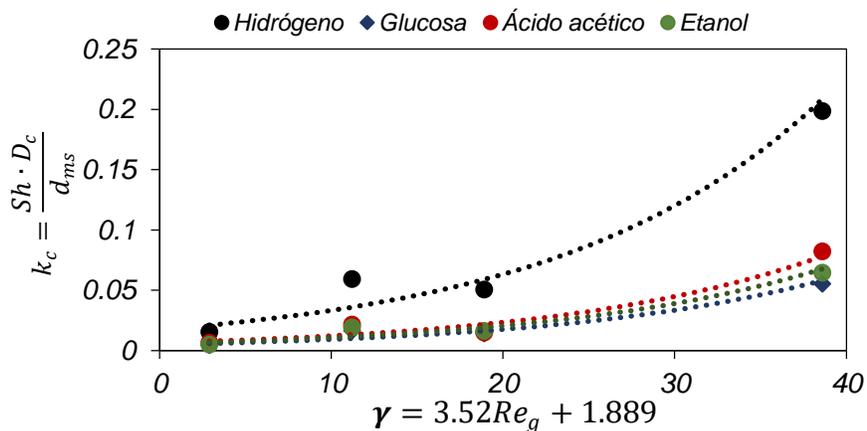


Figura 25. Efecto de la velocidad de corte sobre el coeficiente de transferencia kc

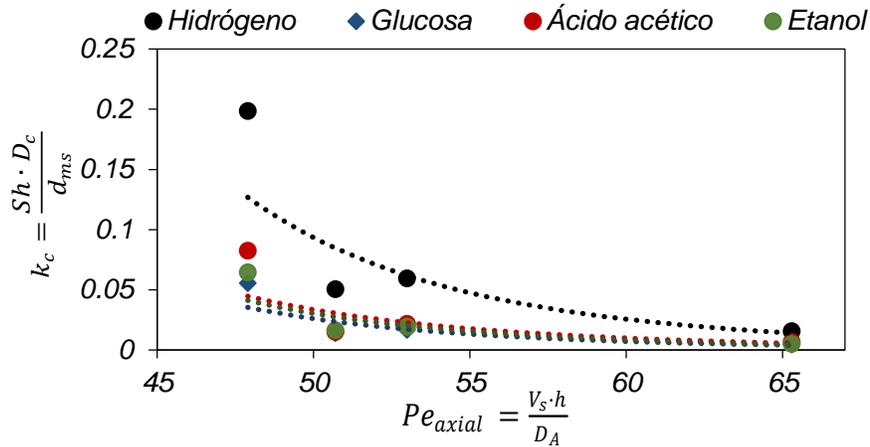


Figura 26. Efecto de la dispersión (Pe_{axial}) sobre el coeficiente k_c

El coeficiente **k_c** es totalmente dependiente de las propiedades del fluido y la hidrodinámica del biorreactor para la transferencia de masa líquido-sólido al igual que el **k_{La}** coeficiente global para la transferencia líquido-gas, y es uno de los parámetros de comparación más comunes para el desempeño entre distintas configuraciones de reactores.

La Figura 27 muestra que el **k_{La}** es directamente proporcional a la velocidad de corte aplicada, puesto que todos los fenómenos anteriormente expuesto mejoran la producción de hidrógeno y ahora también este coeficiente.

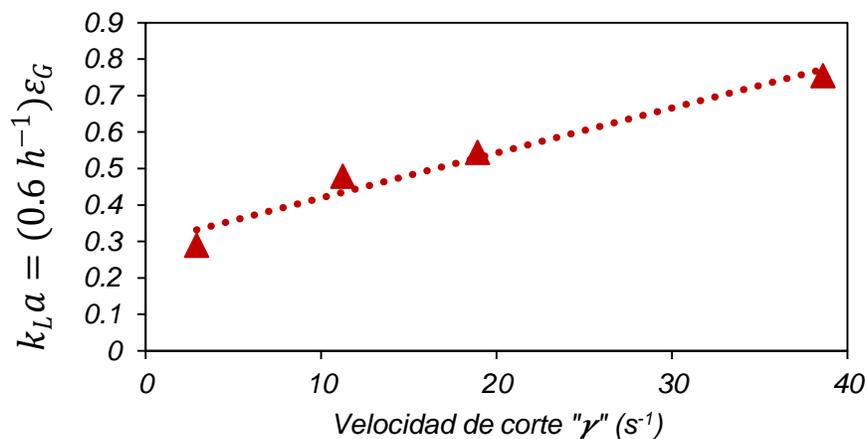


Figura 27. Efecto de la velocidad de corte sobre el coeficiente k_{La}

El valor máximo de k_{La} es 0.75 h^{-1} alcanzado a una velocidad de corte de 38.6 s^{-1} , este valor es 45% más alto que el reportado por *Pauss et al.*, (1990) en 0.4 h^{-1} .

4.4. Conclusiones

Se obtuvo un inóculo productor de hidrógeno y logró inhibir por completo la actividad metanogénica cuando la velocidad ascensional fue de $5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ y un valor de 38 s^{-1} para velocidad de corte, donde la mayor productividad y el máximo rendimiento fueron $1.8 \text{ LH}_2 \text{ L}_{\text{reactor}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $1.8 \text{ moles de H}_2\cdot\text{mol glucosa}^{-1}$.

Además el análisis hidrodinámico indicó que la inhibición de la actividad metanogénica pudo llevarse a cabo en regímenes laminares ($\text{NRe}=100$) y es suficiente para considerar que este reactor se comporta más cercano a uno perfectamente agitado cuando la velocidad ascensional fue de $5 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$.

Se mostró que el estrés hidrodinámico aplicado tiene un efecto en las estructuras granulares, disminuyendo su diámetro a lo largo del tiempo de la experimentación y posiblemente sea una de las razones para incrementar la actividad acidogénica y producción de hidrógeno con biomasa granular metanogénica.

La interacción entre la hidrodinámica aplicada y la consecuente reducción del diámetro granular contribuyó teóricamente el transporte de masa tanto líquido-sólido (kc) como líquido-gas (k_{La}). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la degradación de glucosa cuanto mayor era el coeficiente de transferencia kc .

Estos resultados se establecieron como las condiciones de operación para la siguiente etapa experimental, para la aclimatación y operación de biomasa granular capaz de producir hidrógeno a partir de lactosuero.

5. Producción de biohidrógeno a partir de lactosuero ácido en un reactor EGSB: efecto del hidróxido o bicarbonato de sodio para el control del pH

5.1. Introducción

La producción de hidrógeno a partir de lactosuero ha sido estudiada, en varios tipos de reactores (CSTR, UASB y AFBR), modo de operación (continuo, discontinuo y lotes), el efecto de la carga orgánica sobre la producción de biohidrógeno y la dinámica microbiana (Castelló *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2016; Perna *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2007). Sin embargo, en algunas de las investigaciones ocupan lactosuero en polvo y otras el lactosuero real (Azbar *et al.*, 2009; Castelló *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2014; Perna *et al.*, 2013). Además, la evaluación de diferentes estrategias de arranque de biorreactores UASB usando biomasa granular y disgregada (Carrillo-Reyes *et al.*, 2012). Por otro lado, en más de la mitad de las investigaciones reportan producción de metano durante la operación. Esto es posible debido a: i) Ineficacia del pretratamiento al inóculo o ii) ingreso de microorganismos productores de metano durante la operación. Lo anterior sugiere que la actividad metanogénica debe ser inhibida continuamente. La forma de inhibir continuamente la producción de metano es mediante el manejo de los parámetros operativos como ya se vio en la sección anterior (estrés hidrodinámico). Se considera a la inhibición de la actividad metanogénica y a la proporción constante de hidrógeno como parámetros de estabilidad del bioproceso.

Para dirigir el proceso hacia la producción de hidrógeno a partir de biomasa granular metanogénica, es necesario proveer de las condiciones necesarias para que esta reacción biológica tenga lugar como valores de pH, la fuente del inóculo y el sustrato. Las fuentes de inóculos mayormente reportada son a partir de lodos metanogénicos, debido a la syntrofia entre microorganismos fermentativos productores de hidrógeno que lo producen como metabolito primario intermediario para la formación de metano. Existen comunidades que producen y consumen H₂ en un mismo inóculo por lo que se debe existir una presión de selección mediante diferentes métodos o pretratamientos para llegar a este objetivo (Ruggeri *et al.*, 2015b). En la literatura se reporta sobre la ventaja que tiene las velocidades específicas de microorganismos fermentativos sobre los metanógenos, que es

mayor alrededor de 5 veces. Sin embargo, en sistemas con biomasa granular los comportamientos son diferentes, puesto que el lavado celular puede ocurrir principalmente en capas externas debido al estrés hidrodinámico aplicado y que es la primera parte en colisionar contra otros gránulos, pero no internas donde los metanógenos se concentran. Siendo un sistema de reacción heterogéneo debe tratarse como un sistema con múltiples resistencias donde se involucran los efectos del transporte (*Doran, 2013*).

Uno de los aspectos mayormente estudiados en la fermentación oscura es el pH y se reporta que valores entre 5.5 y 6.5 son en donde se reportan los mejores resultados para diversos tipos de sustratos. Además, siendo un agua naturalmente ácida, es preciso operar en rangos cercanos al del agua residual mientras sea posible debido a los gastos que implicaría estabilizar el proceso en pH más elevados. *Venetsaneas, et al., (2009)* estudió el proceso de fermentación oscura suministrando lactosuero ácido acoplado a metanogénesis. Probó dos tipos de control i) control de alcalinidad que consistía en suministrar 20g de NaHCO_3 por litro de lactosuero y ii) control de pH a 5.2 suministrando NaOH 2N. Observaron que la productividad de bioH_2 con control de alcalinidad y pH fueron de 2.9 y 1.9 $\text{LH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectivamente. Por lo que sugirieron que el control de alcalinidad mejora la producción de bioH_2 . Además, se ha utilizado el suministro de alcalinidad para el proceso de fermentación oscura debido a la rápida acidificación de reactores de acuerdo a lo reportado por *Castelló, et al., (2009)*. ¿Tiene algún efecto positivo la alcalinidad en el proceso de fermentación oscura?

Tomando en cuenta lo anterior, el objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de la producción de hidrógeno aplicando diferentes cargas orgánicas de lactosuero ácido real como sustrato, controlando el pH a 4.5 con hidróxido de sodio o bicarbonato de sodio; además de evaluar su efecto en la hidrodinámica del reactor y su efecto en los gránulos anaerobios

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Diseño y construcción de un Reactor EGSB

El reactor EGSB fue construido de vidrio (Figura 28), formado por dos secciones: la primera es la zona de elevación y donde se encuentran los gránulos y mide 6.4 cm de diámetro, la zona dos es la de sedimentación que se encuentra en la parte superior del reactor con 10.4 cm de diámetro y altura de 15 cm. La altura total del reactor fue de 60 cm y un volumen de trabajo de 2.8 L. El fondo del reactor fue cónico para distribuir el flujo uniformemente. La relación altura/diámetro fue en 9.

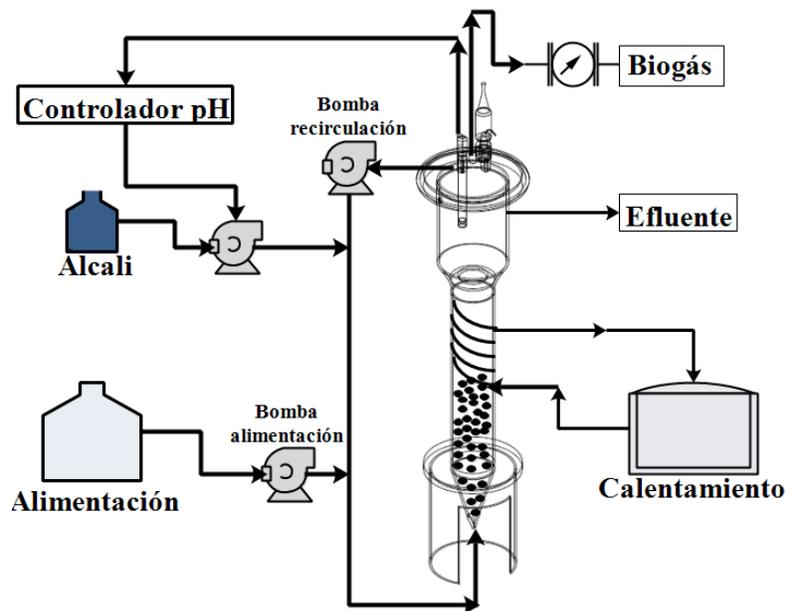


Figura 28. Esquema de operación EGSB

La temperatura de operación fue de 35°C, la temperatura se mantuvo mediante recirculación de agua en una tubería plástica alrededor del reactor. Se utilizaron bombas peristálticas (Masterflex, Easy-Load) para el influente, recirculación y álcali. El pH se mantuvo a 4.5 usando un controlador de pH (Eutech Instrument, pH 190 series), suministrando NaOH o NaHCO₃ a 60 g/L ambas soluciones.

5.2.2. Sustrato e inóculo

Se utilizó lactosuero ácido obtenido de una empresa productora de quesos en el estado de Querétaro. El agua se almacenó a 4°C y agitó antes de usarse. Se utilizaron 7 lotes, tomados cada 30 días. La concentración de azúcares totales para cada condición fue ajustada por dilución. El inóculo fue lodo granular metanogénico obtenido de un reactor UASB escala real para el tratamiento de aguas residuales de la industria cervecera. El inóculo fue aclimatado de tal forma que no produzca metano pero si hidrógeno.

5.2.3. Estrategia experimental

5.2.3.1. Aclimatación

Las condiciones operacionales para la inhibición de la actividad metanogénica fueron: operación en régimen continuo con un TRH fue de 4.5 horas suministrando lactosuero ácido, pH de 4.5, Vs de 5 m·h⁻¹, la velocidad de carga orgánica aplicada fue de 7 kg-azúcares totales·m⁻³·d⁻¹. La concentración inicial de lodos anaerobio granular fue de 7.3 gSV·L⁻¹ sin purga de lodos. Éstas fueron las condiciones en las

que se observó la inhibición de la actividad metanogénica, máxima productividad de y rendimiento de biohidrógeno en la primera fase experimental.

5.2.3.2. Efecto de la carga orgánica y agente para el control de pH en la producción de biohidrógeno

Se realizaron dos fases de experimentales, la primera fue controlar el pH con hidróxido de sodio (NaOH) aplicando cargas de 7, 18, 25, 32 y 42 kg-azúcares totales·m⁻³·d⁻¹. La siguiente fase fue suministrar bicarbonato de sodio aplicando cargas de 7, 14, 21, 27 y 57 kg-azúcares totales·m⁻³·d⁻¹. Cada carga orgánica fue operada en promedio por 10 días, que son 53 veces el TRH. El inóculo fue el mismo que el de la etapa de hidróxido. El TRH, pH y Vs se mantuvieron constantes durante las fases de aclimatación, fase con hidróxido y bicarbonato. Los valores promedio de las caracterizaciones se muestran en la Tabla 5, la empresa Carol tomó 8 muestras integrales cada 20 días de lactosuero ácido, las muestras fueron almacenadas a 4°C. La relación C/N/F para éste lactosuero es 100/1.6/0.24, mientras que para la fase experimental anterior la relación fue 100/7.5/2.5.

Tabla 5. Caracterización del lactosuero ácido

Parámetro	Valor	Unidad
DQO total	57.9 ± 0.99	g/L
DQO soluble	53.4 ± 0.95	g/L
Carbohidratos totales (totales)	24.49 ± 2.34	g/L
Carbohidratos totales (solubles)	20.69 ± 5.7	g/L
pH	4.44	
Fósforo	2.44 ± 0.02	mg/L
Nitrógeno	165.5 ± 0.02	mg/L
Alcalinidad	N.D.	mg CaCO ₃ /L
Sólidos suspendidos totales	7.27 ± 0.98	g/L
Sólidos suspendidos volátiles	7.12 ± 0.94	g/L
Calcio	160	mg/L
N.D. No detectable		

5.2.4. Técnicas analíticas

5.2.4.1. Composición del gas. La composición del biogás (hidrógeno, metano y dióxido de carbono) se midió con un cromatógrafo de gases (SRI 8610C) acoplado a un detector de conductividad térmica y dos columnas empacadas de acero inoxidable (6' x 1/8 gel x 6' 1/8" corte molecular 13X). La temperatura del inyector y

del detector fue de 90°C y 150°C, respectivamente. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador a 50 psi.

5.2.4.2. *Producción de biogás.* Para medir la producción de biogás se utilizó un medidor de flujo Ritter tipo MGC-1 V3.1 PMMA.

5.2.4.3. *Cuantificación de carbohidratos totales.* Se realizó siguiendo el método fenol-sulfúrico utilizando glucosa como referencia (*Dubois et al., 1956*).

5.2.4.4. *Granulometría.* Se fotografiaron los gránulos y midió su diámetro por análisis de imágenes usando un estereoscopio (Carl Zeiss, Germany) software Axio Vision LE.

5.3. Resultados

5.3.1. Aclimatación

Se observó que la producción de metano fue disminuida al día 6 de operación como lo muestra la

Otra idea viene sobre la saturación y sobresaturación del biogás en la fase líquida, debido a su presión parcial y relacionando con la Ley de Henry para estimar su concentración. Sin embargo, es importante mencionar que la presión medida en el reactor alcanzó un máximo de 19.5 psi para la etapa de hidróxido, mientras que para la de bicarbonato su máximo fue de 5 psi. De esta forma se puede excluir el fenómeno llamado supersaturación del hidrógeno en la fase líquida e inhibición por hidrógeno disuelto la etapa de bicarbonato (*Beckers et al., 2015; Kraemer y Bagley, 2006; Pauss et al., 1990*).

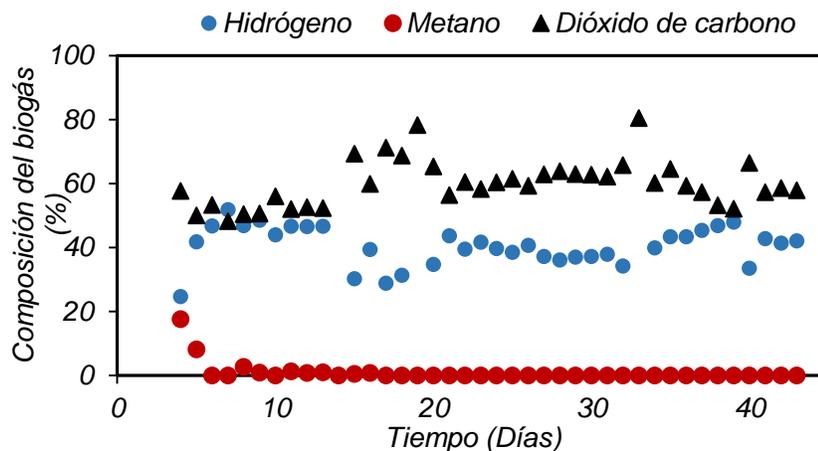


Figura 29, a este tiempo la concentración de metano está por debajo del límite de detección mientras que el hidrógeno está en 47%. El porcentaje de metano disminuyó mientras que la del hidrógeno aumentaba. La carga para la aclimatación

fue de 7 kg-azúcares totales·m⁻³·d⁻¹ suministrando NaOH para el control de pH. Después de observar la disminución de la actividad metanogénica, se continuó operando con carga de 7 kg-azúcares totales·m⁻³·d⁻¹.

5.3.2. Efecto de la carga orgánica y agente para el control de pH en la producción de biohidrógeno

La

Otra idea viene sobre la saturación y sobresaturación del biogás en la fase líquida, debido a su presión parcial y relacionando con la Ley de Henry para estimar su concentración. Sin embargo, es importante mencionar que la presión medida en el reactor alcanzó un máximo de 19.5 psi para la etapa de hidróxido, mientras que para la de bicarbonato su máximo fue de 5 psi. De esta forma se puede excluir el fenómeno llamado supersaturación del hidrógeno en la fase líquida e inhibición por hidrógeno disuelto la etapa de bicarbonato (Beckers et al., 2015; Kraemer y Bagley, 2006; Pauss et al., 1990).

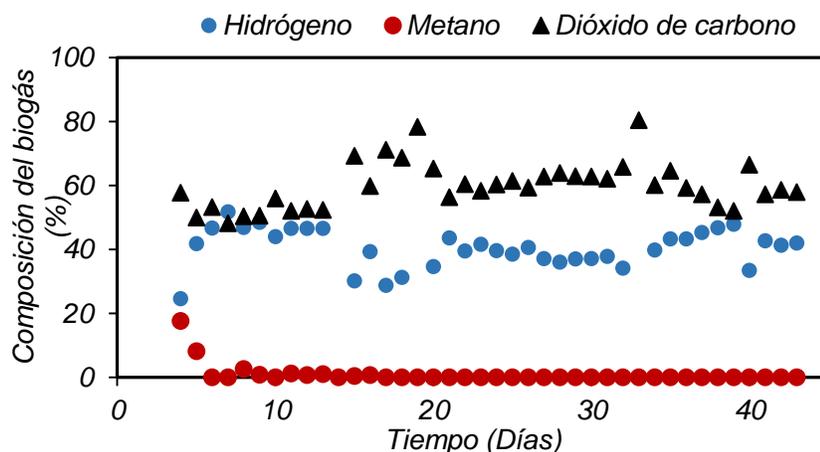


Figura 29 muestra la evolución de la porcentaje de hidrógeno en el biogás durante la etapa de hidróxido, se observa que es relativamente estable si se compara con la fase de bicarbonato en la Figura 30, para el caso del bicarbonato se observó una disminución progresiva del porcentaje de hidrógeno en el tiempo, con un máximo de 65% y hasta llegar a un valor de 2%.

Ciertamente el efecto de la relación de alcalinidad (g sales de fosfato/g sustrato seco) se ha probado de forma sistemática por Valdez-Vazquez y Poggi-Valardo, (2009) para producir de hidrógeno a partir de residuos, donde la mejor productividad de hidrógeno fue de 463.7 mLH₂·L⁻¹·d⁻¹ y una relación de alcalinidad de 0.25; valores superiores de alcalinidad desempeñaron producciones más bajas. Sugieren que la inhibición podría ser por el incremento de la presión osmótica.

Otra sugerencia sería que el hidrógeno producido podría reaccionar con el bicarbonato lo que disminuiría el porcentaje de hidrógeno ya que se transfiere y producir dióxido de carbono en forma gaseosa. Las reacciones para cuando se suministra hidróxido (1) y bicarbonato (2) se muestran a continuación:



Otra idea viene sobre la saturación y sobresaturación del biogás en la fase líquida, debido a su presión parcial y relacionando con la Ley de Henry para estimar su concentración. Sin embargo, es importante mencionar que la presión medida en el reactor alcanzó un máximo de 19.5 psi para la etapa de hidróxido, mientras que para la de bicarbonato su máximo fue de 5 psi. De esta forma se puede excluir el fenómeno llamado supersaturación del hidrógeno en la fase líquida e inhibición por hidrógeno disuelto la etapa de bicarbonato (Beckers et al., 2015; Kraemer y Bagley, 2006; Pauss et al., 1990).

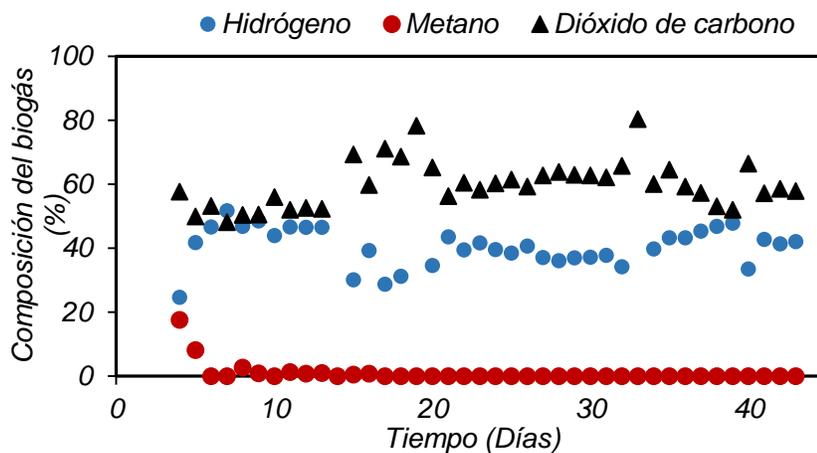


Figura 29. Evolución del biogás en el tiempo, fase de hidróxido

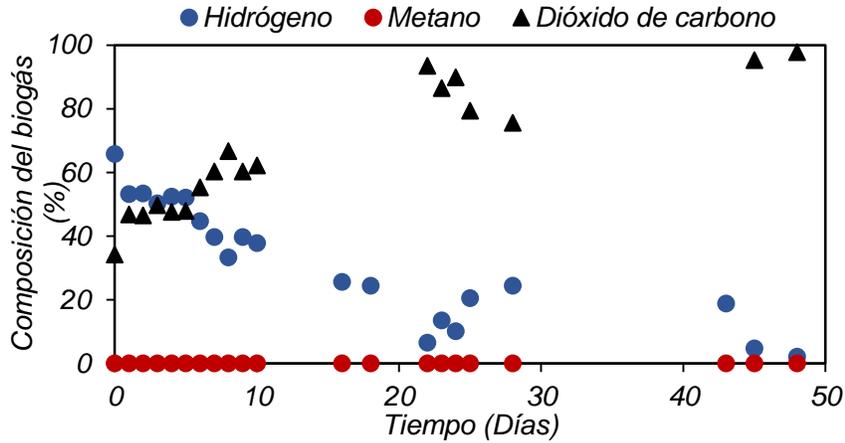


Figura 30. Evolución del biogás en el tiempo, fase de bicarbonato

La Figura 31 muestra el efecto de la carga orgánica sobre la concentración de hidrógeno en las etapas de hidróxido y bicarbonato de sodio. En cuanto a la fase de hidróxido, la concentración de hidrógeno desempeña una tendencia estable al aumento de carga, mientras que la tendencia en la fase de bicarbonato se observó una caída abrupta en el porcentaje de hidrógeno respecto al aumento de carga.

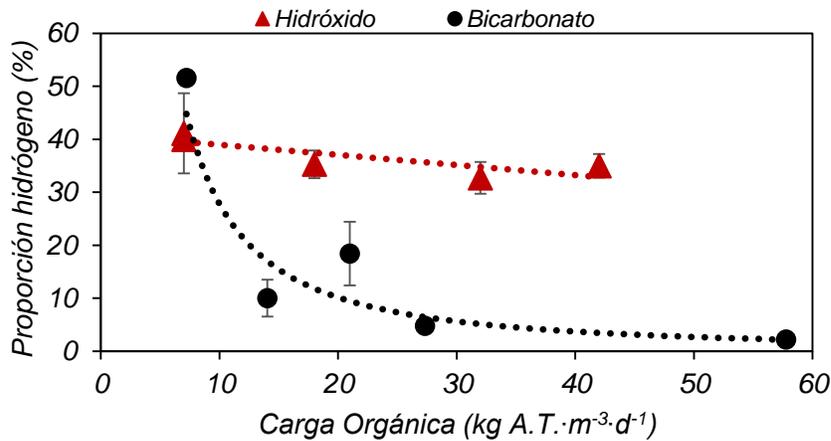


Figura 31. Efecto de la carga orgánica sobre la concentración de hidrógeno

La Figura 32 muestra el efecto de la carga orgánica sobre la productividad de hidrógeno, la tendencia es en forma de campana cuando se suministra hidróxido sugiriendo un rango máximo, mientras que la tendencia para la fase de bicarbonato desarrolla una caída significativa. Las máximas productividades para la fase de hidróxido y bicarbonato fueron 4.34 y 0.39 LH₂·L⁻¹·d⁻¹, respectivamente.

Las productividades de hidrógeno se analizaron con un ANOVA multifactorial, prueba de rangos múltiples y sus respectivas regresiones con el programa Statgraphics. Es importante mencionar el aumento en la energía libre de Gibbs para la fermentación oscura cuanto más ácido es el medio (reacciones menos favorables con un valor de $-250 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ de glucosa⁻¹), que impacta en las productividades de biogás.

Este ANOVA descompone la variabilidad entre la productividad en contribuciones debidas a sus factores mediante suma de cuadrados tipo III (contribución entre factores se elimina). La significancia del valor fue menor a 0.05, por lo que si se obtuvo un efecto significativo entre la carga orgánica y la productividad de hidrógeno, esto para ambas fases de experimentales.

La prueba de rangos múltiples comparó las medias entre cada una de las productividades de la misma fase, para el hidróxido todas las medias son significativamente diferentes con un 95% de confianza. Mientras que para el bicarbonato, las productividades en las cargas de 27 y 58 $\text{kg A.T.}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ no son estadísticamente diferentes con un 95% de confianza.

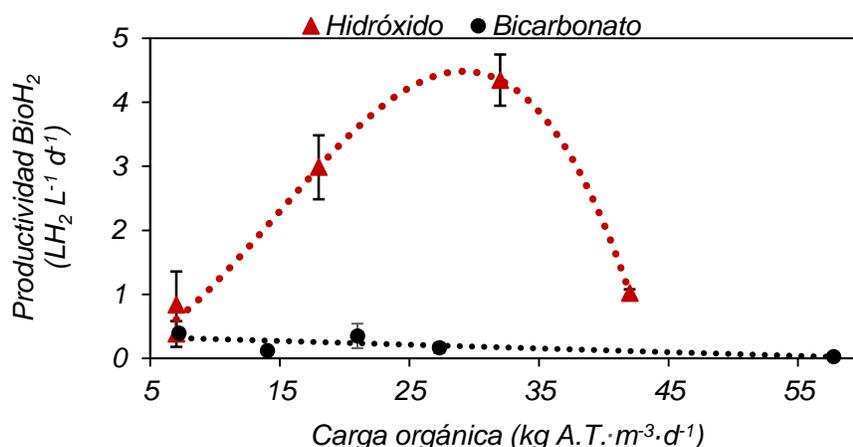


Figura 32. Efecto de la carga orgánica sobre la productividad de hidrógeno

La Tabla 6 muestra los resultados de otros estudios realizados para la producción de hidrógeno con lactosuero ácido, donde dos investigaciones observaron detección de metano, uno utilizó hidróxido de potasio y otro bicarbonato de sodio para el control del pH. Calculando los rendimientos de los trabajos de la Tabla 6, los valores más altos son los reportados por Azbar, et al., (2009) y en este trabajo con 0.25 y 0.13 LH_2/kg de DQO suministrada; ambas investigaciones utilizaron hidróxido para el control del pH.

Estos rendimientos sugieren que el uso de hidróxido tiene un efecto positivo en la producción de hidrógeno cuando se suministra lactosuero ácido. En esta investigación el metano no fue detectado después de la etapa de aclimatación, que también demuestra la robustez del tratamiento para mantener la producción de hidrógeno estable y sin detección de metano.

Tabla 6. Estudios realizados para la evaluar la producción de hidrógeno con lactosuero ácido

Control pH	Productividad ($LH_2 \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$)	Carga orgánica ($kgDQOm^3d^{-1}$)	Inóculo	Reactor	TRH (h)	Metano	Referencia
KOH	2.5	10	Lodo anaerobio	CSTR	24	Detectado	(Azbar et al., 2009)
NaHCO ₃	0.122	20	Lodo anaerobio	UASB	12	Detectado	(Castelló et al., 2009)
-	0.31	12.5	Microflora mixta	AFBR	48	N.D.	(Fernández et al., 2014)
NaHCO ₃	2.9	60	Autóctono	CSTR	24	N.D.	(Venetsaneas et al., 2009b)
NaOH	1.9						
NaOH	4.34	32.9	Lodo granular anaerobio	EGSB	4.5	N.D.	Este estudio
NaHCO ₃							

N.D. No detectado

En cuanto al efecto de la carga orgánica sobre la degradación de azúcares totales, ambas fases se comportan de forma similar como lo muestra la Figura 33; se puede inferir a partir de esto que no hay un efecto del hidróxido o bicarbonato sobre el consumo de carbohidratos, y sugiere que la disminución en la concentración y productividad de hidrógeno podría ser por la reacción del hidrógeno y bicarbonato en el medio líquido y no por limitaciones metabólicas.

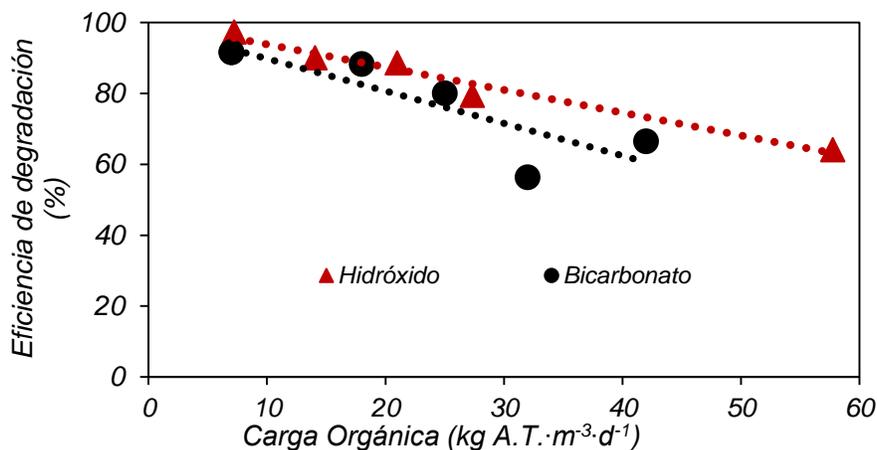


Figura 33. Efecto de la carga orgánica en la eficiencia de degradación de Azúcares Totales

El diámetro granular también cambió en función del tiempo de experimentación y del suministro de hidróxido o bicarbonato. La Figura 34 A) muestra la disminución del diámetro granular cuando se suministra hidróxido; el diámetro granular se hizo más uniforme conforme pasa el tiempo y se redujo 20% si se compara el día 0 con el día 45. El diámetro inicial y final en la fase de hidróxido fue de 1.31 y 1.04 mm, respectivamente. Mientras que la Figura 34 B) muestra la fase de bicarbonato (el diámetro inicial, es el diámetro final de la fase de hidróxido), el diámetro granular aumentó de 1.04 a 2.06 mm que representa un 96% en esta fase. La disminución en el diámetro granular cuando se suministra hidróxido va acompañado de mayores productividades de H₂, mientras que el efecto es completamente contrario cuando se suministra bicarbonato. Sin embargo, se ha reportado inestabilidad y disgregación en las estructuras granulares cuando la actividad acidogénica es dominante (Baloch et al., 2008).

El aumento y la disminución del diámetro granular está en función de múltiples fenómenos fisicoquímicos, hidrodinámicos y termodinámicos como lo sugieren los distintos modelos para la formación y disgregación granular como: Modelo fisicoquímico, del núcleo inerte, presión de selección, de enlace iónico multivalente, enlace por exopolímeros, de adhesión secundaria y translocación protónica por deshidratación local (Baloch et al., 2008; Tay et al., 2000; Wu et al., 1991).

El modelo de translocación sugiere la adhesión de biomasa bacteriana debido a la atracción por cargas eléctricas entre la superficie cargada negativamente de las bacterias y las capas de microorganismos cargadas positivamente debido a la deshidratación y transporte de protones en la superficie.

Posiblemente el suministro de hidróxido y la producción de hidrógeno tengan un efecto en las cargas eléctricas del gránulo debilitando la estructura, la velocidad de corte se encarga de desprender material granular externo y por consecuencia la reducción en el tamaño de gránulos como lo muestra la Figura 34 (A). Mientras que el suministro de bicarbonato y menor producción de hidrógeno favorece la adhesión de material (biomasa o exopolímeros) y por tanto el aumento del tamaño de gránulo Figura 34 (B), además que la producción de hidrógeno no fue observada y presumiblemente no haya afectado las cargas de los gránulos como lo hizo la etapa de hidróxido debido al flujo de H₂ y por consecuencia de protones que podrían alterar el equilibrio. Se toma en cuenta el modelo de translocación protónica debido a que proporciona una idea de la adhesión y desprendimiento de material granular debido a las cargas eléctricas, mientras que los otros modelos explican sólo la adhesión de material.

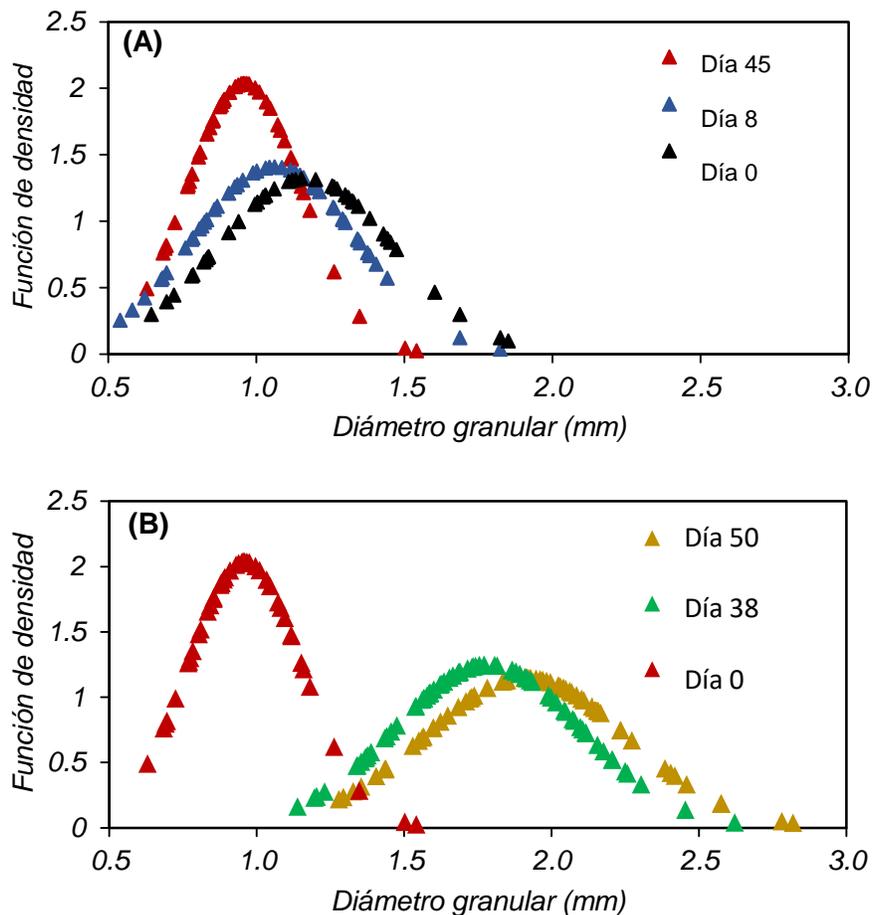


Figura 34. Función de densidad del diámetro granular A) Fase de hidróxido y B) Fase de bicarbonato

El color de los gránulos se muestra completamente negro al inicio de la operación, pero color café claro al final de la fase de hidróxido. Mientras que en la operación con bicarbonato se notan de café más oscuro.

El cambio de color podría producirse por el lavado celular de las capas externas del gránulo que están compuestas por bacterias sulfato-reductoras de color negro (Fang et al., 2002). El lavado celular se refleja en la disminución del diámetro granular.

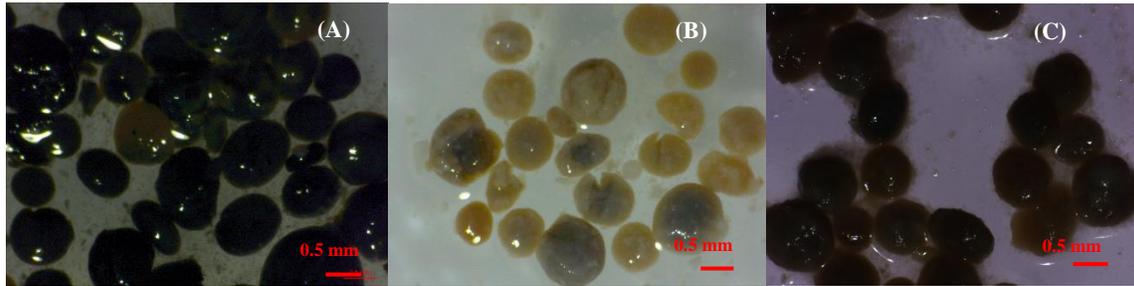


Figura 35. Fotografías de los gránulos A) Inicio de la experimentación B) Final experimentación con hidróxido C) Final experimentación con bicarbonato

La Tabla 7 muestra el diámetro medio Sauter de los gránulos en el tiempo, su velocidad de sedimentación y su velocidad de corte promedio, de tal forma que se puede ver que en la fase de hidróxido la velocidad de sedimentación y velocidad de corte disminuían conforme pasaba el tiempo; mientras que en la fase de bicarbonato tanto la velocidad de sedimentación como la velocidad de corte aumentan. En ambos experimentos la tendencia de la velocidad de sedimentación aumentó aunque en diferente proporción.

De forma contraria lo que pasó con la disminución de la velocidad de sedimentación suministrando glucosa donde el cambio fue de 80 a $38 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ en el experimento del capítulo anterior, esto sugiere que la alimentación y el tipo de agente para el control del pH son factores clave para las estructuras granules de tipo acidogénico. Por ejemplo en todos los experimentos (glucosa y lactosuero) el pH fue 4.5 y el TRH a 4.5 h que son condiciones difíciles para los gránulos “metanogénicos” y en este experimento se observó incluso aumento en el diámetro granular a esas condiciones cuando se suministró lactosuero y bicarbonato para el control del pH. Para el caso del suministro de hidróxido se redujo el diámetro granular pero la densidad aumentó de forma que la velocidad de sedimentación incluso aumentó 3% .

Posiblemente el lactosuero ejerció una presión de selección tal que los microorganismos y su metabolismo pudieron adherir material a las estructuras granulares como pueden ser biomasa y diferentes tipos de exopolisacáricos para aumentar su tamaño, peso, velocidad de sedimentación y por tanto evitar el lavado celular y disgregación granular.

Además, la resistencia al estrés hidrodinámico de gránulos acidogénicos productores de hidrógeno podría ser mayor que la que se reporta para los metanogénicos cuyo valor debe ser menor a 30 s^{-1} y los valores observados en este trabajo llegan a ser hasta de 51 s^{-1} . Esto sugeriría diferente conformación de la arquitectura granular y tipos de material agregado.

Tabla 7. Valores de velocidad de sedimentación y velocidad de corte promedio para el diámetro granular de las fases de hidróxido y bicarbonato

Fase	Día de operación	Diámetro granular, Sauter (mm)	Velocidad de sedimentación ($\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$) $U_t = 0.781 \left[\frac{d_{ms}^{1.6} (\rho_g - \rho_L)}{\rho_L^{0.4} \cdot \mu L^{0.6}} \right]^{0.714}$	Velocidad de corte promedio (s^{-1}) $\gamma = 3.52 Re_g + 1.889$
NaOH	0	1.31	66.0	34.5
	8	1.20	80.7	31.8
	45	1.04	68.3	28.0
NaHCO ₃	0	1.04	68.3	27.7
	38	1.86	83.0	46.2
	50	2.06	93.0	51.0

El efecto que tiene la velocidad de corte sobre el coeficiente global de transferencia se observa en la Figura 36, **kc** es inversamente proporcional a la velocidad de corte promedio aplicada a los gránulos. También debe notarse que el incremento de diámetro granular Este incremento del diámetro granular disminuye las fenómenos de transferencia de masa debido a una disminución en el área superficial del gránulo como se observa en la fase de bicarbonato Figura 36, al incrementarse el área superficial de las partículas (menor diámetro) los coeficientes de transferencia de masa también incrementan como se observa en la fase de hidróxido Figura 36.

La disminución del diámetro granular y velocidad de corte en la fase de hidróxido varía menos y aumenta el **kc**. De acuerdo con González-Gil et al., (2001) los valores de **kc** por debajo de $0.0125 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ presentan limitaciones en transferencia de masa líquido-sólido, en este experimento para las fases de hidróxido y bicarbonato todos los valores de **kc** para lactosa están por arriba de $0.0125 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$.

Es importante recalcar que se utilizaron los valores del coeficiente de difusión corregido para lactosa, debido a que es el único carbohidrato presente en el suero

y el cual sería metabolizado para producir hidrógeno. Además, es la molécula con el coeficiente de difusión más lento si se compara con los ácidos grasos y por tanto para el transporte por difusión sería factor limitante.

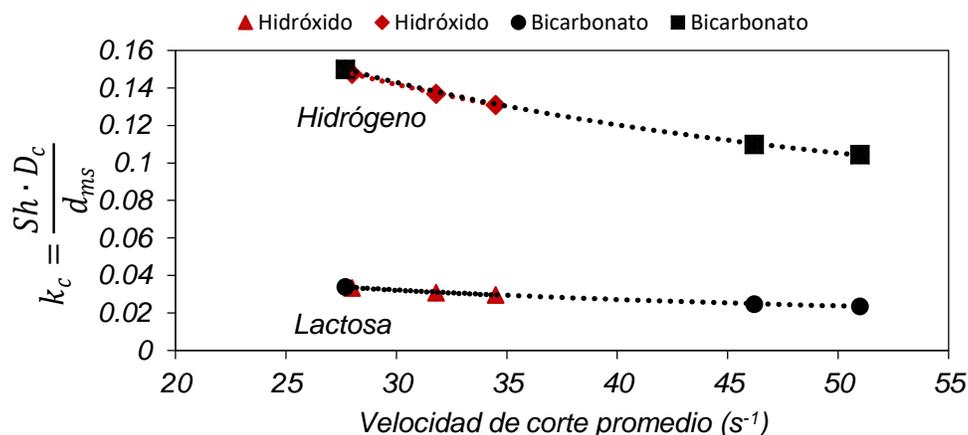


Figura 36. Efecto de la velocidad de corte sobre el coeficiente k_c

Por otro lado, la turbulencia en el biorreactor aumentaba con una tendencia de tipo campana a la carga orgánica en la fase de hidróxido, debido a que la producción de biogás contribuye al mezclado. El efecto de la carga orgánica sobre el número de Reynolds lo muestra la Figura 37, debe tener en cuenta que el valor de número de Reynolds por recirculación de líquido es 100. La contribución a la turbulencia es función de la producción del biogás total, la máxima contribución fue del 21% para la carga de 32 kg A.T.m⁻³.d⁻¹ en la fase de hidróxido; es la condición de mayor productividad de hidrógeno y biogás. La disminución en NRe es al valor de 100 que es la turbulencia generada por la recirculación del agua, la producción de biogás posiblemente haya disminuido debido a un tipo de inhibición por sustrato o por las limitaciones en cuanto a la relación C/N y C/P que son menores 4.6 y 10 veces, respectivamente a la relación que fue suministrada en la primera fase experimental.

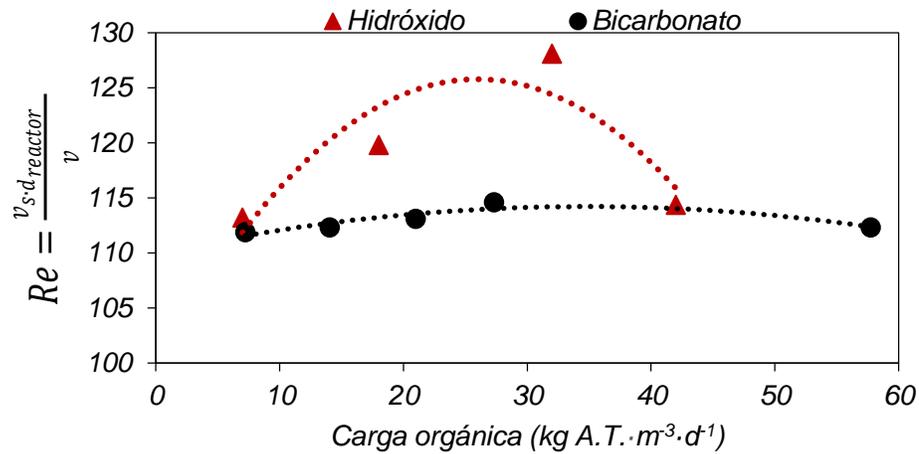


Figura 37. Efecto de la carga orgánica sobre el número de Reynolds

Se observa en la Figura 38 el efecto que tiene la carga orgánica sobre el coeficiente de transferencia (líquido-gas) k_{La} , que sugiere una carga óptima para alcanzar el mayor coeficiente de transferencia si se suministra hidróxido de sodio para el control del pH. Se calculó el coeficiente k_{La} en función del Gas-Holdup del total de biogás (no se evaluó el coeficiente para el hidrógeno específicamente). Debido al diseño del reactor y la producción de biogás en este sistema su coeficiente de transferencia es alto si se compara con el obtenido con Pauss et al., (1990). Esto podría significar un problema ya que a coeficientes de transferencia altos el hidrógeno podría transportarse y reaccionar a gran velocidad tal como se ha planteado con la reacción con el bicarbonato. Se deberá tener en cuenta para futuras investigaciones el dióxido de carbono e hidrógeno disueltos en la fase acuosa y predecir la tasa de reacción para ambos gases.

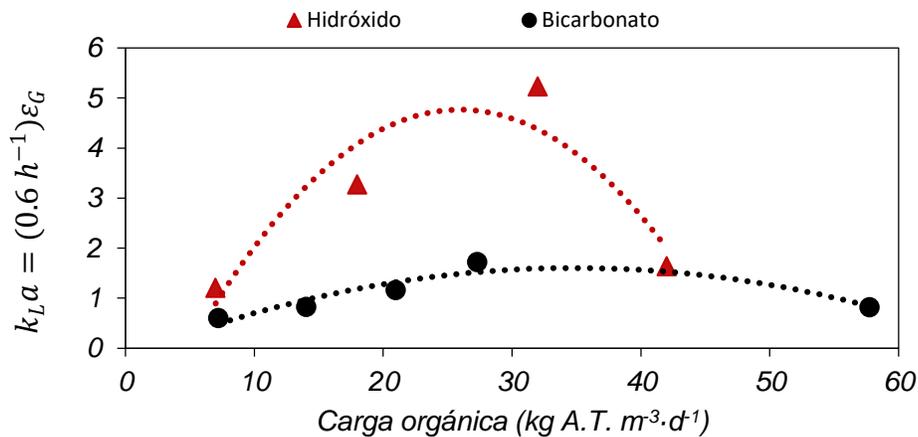


Figura 38. Efecto de la carga orgánica sobre el k_{La}

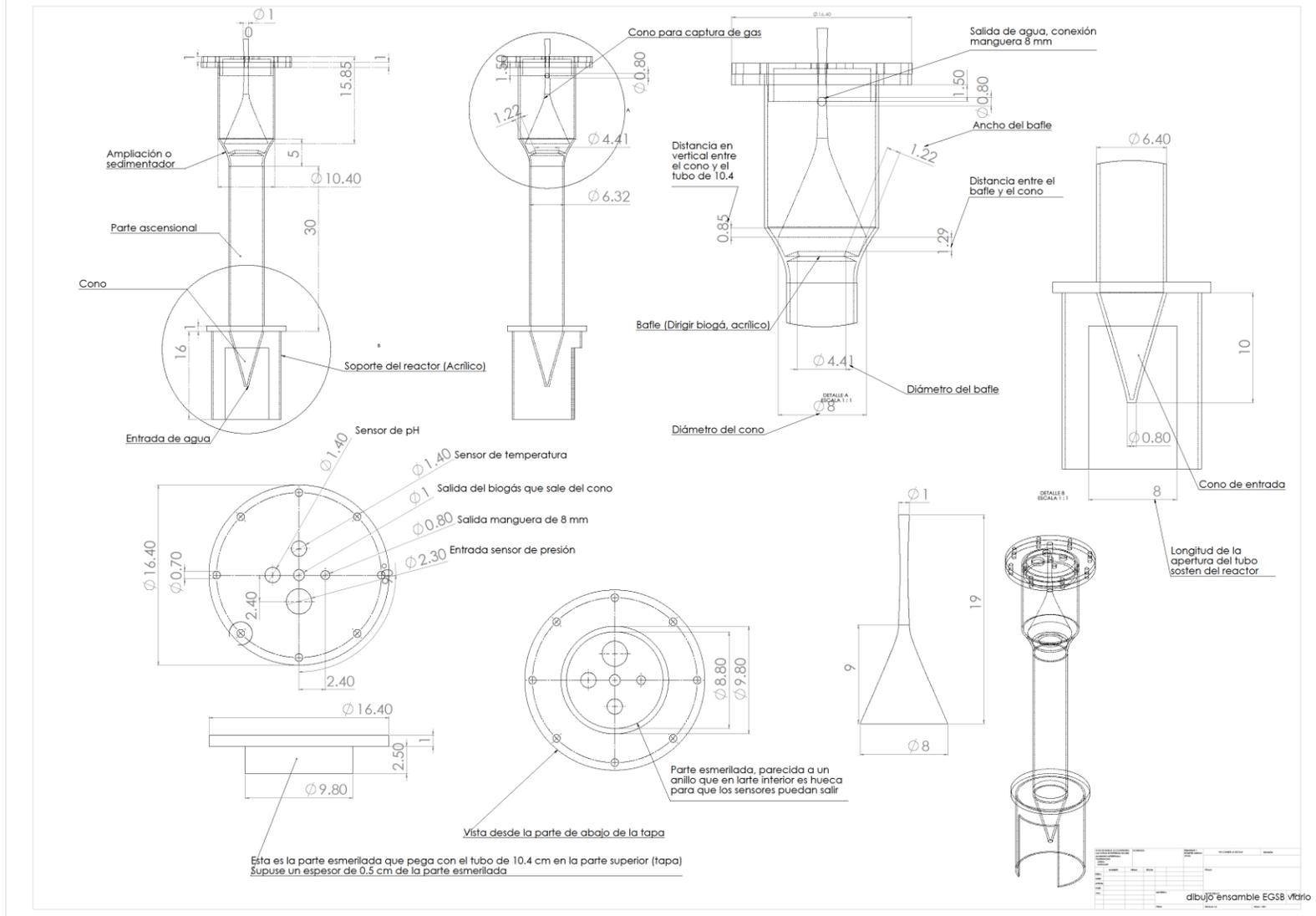
El sumidero de hidrógeno en la reacción con bicarbonato es mayor, lo que podría implicar un mayor consumo de hidrógeno en fase acuosa.

5.4. Conclusiones

En este capítulo se observó que el tipo de álcali para el control del pH tiene efecto sobre la producción de hidrógeno a partir de lactosuero a un pH de 4.5. El uso de hidróxido de sodio desempeñó mejores resultados comparados con el bicarbonato de sodio respecto a la productividad y proporción de hidrógeno en el biogás: 4.34 $\text{LH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y 40%, respectivamente. Además se observó la reducción del diámetro granular y consecuentemente el aumento en el coeficiente global de transferencia **kc**. Mientras que el suministro de bicarbonato tuvo un efecto negativo sobre la productividad, cuyo máximo valor fue 0.39 $\text{LH}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y las concentraciones de hidrógeno disminuyeron de 51 a 2.2%. Se observó que en esta fase el diámetro granular aumentó 98% con respecto a su diámetro inicial. El aumento en el diámetro granular desarrolló velocidad de corte grandes y por tanto mayor resistencia al transporte como lo indica el coeficiente **kc**. La velocidad de sedimentación aumentó en ambos experimentos debido al tamaño y densidad, el aumento fue de 3.4 y 36.1% para hidróxido y bicarbonato, respectivamente. El lactosuero ácido ejerció una presión de selección para que las velocidades de sedimentación incrementaran debido al aumento de la densidad y tamaño comparando estos resultados con los obtenidos suministrando glucosa.

El número de Reynolds fue afectado en 28 y 14% de acuerdo a la carga orgánica en el experimento con hidróxido y bicarbonato, respectivamente. La producción de biogás si contribuyó a la turbulencia en este experimento. En general se obtuvo un proceso mejor y más estable en cuanto a productividad y calidad del biogás cuando se suministró hidróxido de sodio. La dinámica granular fue completamente contraria comparando los dos experimentos.

Anexo 1: Diagrama para la construcción del reactor EGSB



Anexo 2: Productividad académica durante el proyecto de investigación

Cuautle-Marín M.A., Buitrón G, Rivera I. 2016 *Integrated treatment of cheese industry wastewater: A two-stage anaerobic digestion process followed by a microbial electrolysis cell*. XII Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion. Cusco, Perú (Presentación oral)

Cuautle-Marín M.A., Buitrón G, 2016 *Biohydrogen production using acidic cheese whey in an EGSB reactor: Influence of sodium hydroxide or bicarbonate for the pH control*. XII Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion. Cusco, Perú (Presentación oral)

Cuautle-Marín M.A., Buitrón G, 2016 *Effect of hydrodynamic stress in an Expanded Granular Sludge Bed for biohydrogen production from methanogenic sludge*. The 13th IWA leading Edge Conference on Water and Wastewater Technologies. Jerez de la frontera, España (Poster y Poster pitch)

Cuautle-Marín M.A., Buitrón G. 2015 *Efecto de la velocidad ascensional sobre la producción de biohidrógeno*. 3^{er} Encuentro de jóvenes investigadores del estado de Querétaro. Querétaro, México. (Presentación oral)

Cuautle-Marín M.A., Buitrón G. 2015 *Generación de inóculo productor de hidrógeno en un reactor EGSB: inhibición de la actividad metanogénica*. 4th IWA Young Water Professionals Conference. Guanajuato, México (Presentación oral)

Cuautle-Marín M.A., Buitrón G. 2014 *Producción de hidrógeno mediante un biorreactor granular acoplado con membranas*. 2^{do} Encuentro de jóvenes investigadores del estado de Querétaro. Querétaro, México. (Poster)

Bibliografía

- Abreu, A.A., Alves, J.I., Pereira, M.A., Sousa, D.Z., Alves, M.M., 2011. Strategies to suppress hydrogen-consuming microorganisms affect macro and micro scale structure and microbiology of granular sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1766–1775. doi:10.1002/bit.23145
- Abreu, A.A., Danko, A.S., Alves, M.M., 2007. Bio-hydrogen production in an EGSB reactor under mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic conditions.
- Atif, A., Fakhurulrazi, A., Ngan, M., Morimoto, M., Iyuke, S., Veziroglu, N., 2005. Fed batch production of hydrogen from palm oil mill effluent using anaerobic microflora. *Int. J. Hydrog. Energy* 30, 1393–1397. doi:10.1016/j.ijhydene.2004.10.002
- Azbar, N., Çetinkaya Dokgöz, F.T., Keskin, T., Korkmaz, K.S., Syed, H.M., 2009. Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *Int. J. Hydrog. Energy* 34, 7441–7447. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.04.032
- Bakonyi, P., Nemestóthy, N., Simon, V., Bélafi-Bakó, K., 2014a. Fermentative hydrogen production in anaerobic membrane bioreactors: A review. *Bioresour. Technol.* 156, 357–363. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.079
- Bakonyi, P., Nemestóthy, N., Simon, V., Bélafi-Bakó, K., 2014b. Review on the start-up experiences of continuous fermentative hydrogen producing bioreactors. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 40, 806–813. doi:10.1016/j.rser.2014.08.014
- Baloch, M.I., Akunna, J.C., Kierans, M., Collier, P.J., 2008. Structural analysis of anaerobic granules in a phase separated reactor by electron microscopy. *Bioresour. Technol.* 99, 922–929. doi:10.1016/j.biortech.2007.03.016
- Beckers, L., Masset, J., Hamilton, C., Delvigne, F., Toye, D., Crine, M., Thonart, P., Hiligsmann, S., 2015. Investigation of the links between mass transfer conditions, dissolved hydrogen concentration and biohydrogen production by the pure strain *Clostridium butyricum* CWBI1009. *Biochem. Eng. J.* 98, 18–28. doi:10.1016/j.bej.2015.01.008
- Brito, A.G., Melo, L.F., 1999. Mass transfer coefficients within anaerobic biofilms: effects of external liquid velocity. *Water Res.* 33, 3673–3678. doi:10.1016/S0043-1354(99)00078-0
- Buffière, P., Fonade, C., Moletta, R., 1998. Liquid mixing and phase hold-ups in gas producing fluidized bed bioreactors. *Chem. Eng. Sci.* 53, 617–627. doi:10.1016/S0009-2509(97)00347-3
- Buitrón, G., Carvajal, C., 2010. Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresour. Technol.* 101, 9071–9077. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.127
- Carrillo-Reyes, J., Celis, L.B., Alatríste-Mondragón, F., Razo-Flores, E., 2014. Decreasing methane production in hydrogenogenic UASB reactors fed with cheese whey. *Biomass Bioenergy* 63, 101–108. doi:10.1016/j.biombioe.2014.01.050

- Carrillo-Reyes, J., Celis, L.B., Alatraste-Mondragón, F., Razo-Flores, E., 2012. Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *Int. J. Hydrog. Energy*, XII International Symposium on Polymer Electrolytes: New Materials for Application in Proton Exchange Membrane Fuel Cells 37, 5591–5601. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.01.004
- Carvalho, F., Prazeres, A.R., Rivas, J., 2013. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Sci. Total Environ.* 445–446, 385–396. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.12.038
- Castelló, E., García y Santos, C., Iglesias, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L., Etchebehere, C., 2009. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *Int. J. Hydrog. Energy*, 2nd International Conference on Hydrogen Safety 2nd International Conference on Hydrogen Safety 34, 5674–5682. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.05.060
- Chu, C.-Y., Wu, S.-Y., Hsieh, P.-C., Lin, C.-Y., 2011. Biohydrogen production from immobilized cells and suspended sludge systems with condensed molasses fermentation solubles. *Int. J. Hydrog. Energy*, 2010 Asian/APEC BioH2 36, 14078–14085. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.04.101
- CONAGUA, 2014. ESTADÍSTICAS DEL AGUA EN MÉXICO EDICIÓN 2104.
- Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C.B., Rosales-Colunga, L.M., de León-Rodríguez, A., Razo-Flores, E., 2009. Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *Int. J. Hydrog. Energy*, 2nd World Hydrogen Technologies Convention 2nd World Hydrogen Technologies Convention 34, 4296–4304. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.02.063
- Davis, M.E., Davis, R.J., 2003. *Fundamentals of chemical reaction engineering*, International ed. ed, McGraw-Hill chemical engineering series. McGraw-Hill, Boston.
- De Gioannis, G., Friargiu, M., Massi, E., Muntoni, A., Poletini, A., Pomi, R., Spiga, D., 2014. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. *Int. J. Hydrog. Energy* 39, 20930–20941. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.10.046
- Doran, P.M., 2013. *Bioprocess engineering principles*, 2nd ed. ed. Elsevier/Academic Press, Amsterdam ; Boston.
- dos Reis, C.M., Silva, E.L., 2011. Effect of upflow velocity and hydraulic retention time in anaerobic fluidized-bed reactors used for hydrogen production. *Chem. Eng. J.* 172, 28–36. doi:10.1016/j.cej.2011.05.009
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, Pa., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- Fang, H.H.P., Liu, H., Zhang, T., 2002. Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 78, 44–52. doi:10.1002/bit.10174
- Fernández, C., Carracedo, B., Martínez, E.J., Gómez, X., Morán, A., 2014. Application of a packed bed reactor for the production of hydrogen from cheese whey permeate: Effect of organic loading rate. *J. Environ. Sci. Health Part A* 49, 210–217. doi:10.1080/10934529.2013.838885

- Fernández-Martín, F., 1984. Viscosity and heat capacity of whey retentates from sheep's milk cheese. *J. Dairy Res.* 51, 455. doi:10.1017/S002202990002375X
- Garibay, M.G., Ramírez, R.Q., Canales, A.L.-M., 1993. *Biotecnología alimentaria*. Editorial Limusa.
- Gonzalez-Gil, G., Seghezzi, L., Lettinga, G., Kleerebezem, R., 2001. Kinetics and mass-transfer phenomena in anaerobic granular sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 73, 125–134.
- Guo, G., 2002. The effects of local hydrodynamics on mass transfer in disordered porous media. Louisiana State University.
- Guo, W.-Q., Ren, N.-Q., Wang, X.-J., Xiang, W.-S., Meng, Z.-H., Ding, J., Qu, Y.-Y., Zhang, L.-S., 2008a. Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *Int. J. Hydrog. Energy* 33, 4981–4988. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.05.033
- Guo, W.-Q., Ren, N.-Q., Wang, X.-J., Xiang, W.-S., Meng, Z.-H., Ding, J., Qu, Y.-Y., Zhang, L.-S., 2008b. Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *Int. J. Hydrog. Energy*, 2nd Asian Bio Hydrogen Symposium 33, 4981–4988. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.05.033
- Hafez, H., Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., Margaritis, A., El Naggar, H., 2009. Comparative assessment of decoupling of biomass and hydraulic retention times in hydrogen production bioreactors. *Int. J. Hydrog. Energy* 34, 7603–7611. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.07.060
- Hafez, H., Nakhla, G., El Naggar, H., 2010. An integrated system for hydrogen and methane production during landfill leachate treatment. *Int. J. Hydrog. Energy*, Novel Hydrogen Production Technologies and Applications Novel Hydrogen Production Technologies and Applications 35, 5010–5014. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.08.050
- Hallenbeck, P.C., 2009. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *Int. J. Hydrog. Energy* 34, 7379–7389. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.12.080
- Hallenbeck, P.C., Ghosh, D., 2009. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends Biotechnol.* 27, 287–297. doi:10.1016/j.tibtech.2009.02.004
- Henze, M., 2008. *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*. IWA Publishing.
- Hernández-Mendoza, C.E., Buitrón, G., 2014. Suppression of methanogenic activity in anaerobic granular biomass for hydrogen production: Anaerobic granules for hydrogen production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89, 143–149. doi:10.1002/jctb.4143
- Hwang, M.H., Jang, N.J., Hyun, S.H., Kim, I.S., 2004. Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. *J. Biotechnol.* 111, 297–309. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.04.024
- IBORRA, F.C.M., TEJERO, J., 2010. *REACTORES QUÍMICOS*.
- Jung, K.-W., Kim, D.-H., Kim, S.-H., Shin, H.-S., 2011. Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresour. Technol.* 102, 8612–8620. doi:10.1016/j.biortech.2011.03.056

- Kapdan, I.K., Kargi, F., 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 569–582. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.09.015
- Kraemer, J.T., Bagley, D.M., 2006. Supersaturation of Dissolved H₂ and CO₂ During Fermentative Hydrogen Production with N₂ Sparging. *Biotechnol. Lett.* 28, 1485–1491. doi:10.1007/s10529-006-9114-7
- Lamed, R.J., Lobos, J.H., Su, T.M., 1988. Effects of Stirring and Hydrogen on Fermentation Products of *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1216–1221.
- Lee, H.-S., 2009. Biological Hydrogen Production from Biomass Using Dark Fermentation and Microbial Electrolysis Cell. ProQuest.
- Lee, H.-S., Salerno, M.B., Rittmann, B.E., 2008. Thermodynamic Evaluation on H₂ Production in Glucose Fermentation. *Environ. Sci. Technol.* 42, 2401–2407. doi:10.1021/es702610v
- Lee, K., Lin, P., Fangchiang, K., Chang, J., 2007. Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor. *Int. J. Hydrog. Energy* 32, 950–957. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.09.018
- Lee, K.-S., Lo, Y.-C., Lin, P.-J., Chang, J.-S., 2006. Improving biohydrogen production in a carrier-induced granular sludge bed by altering physical configuration and agitation pattern of the bioreactor. *Int. J. Hydrog. Energy* 31, 1648–1657. doi:10.1016/j.ijhydene.2005.12.020
- Lee, K.-S., Lo, Y.-S., Lo, Y.-C., Lin, P.-J., Chang, J.-S., 2003. H₂ production with anaerobic sludge using activated-carbon supported packed-bed bioreactors. *Biotechnol. Lett.* 25, 133–138. doi:10.1023/A:1021915318179
- Levenspiel, O., 2002. *Ingeniería de las reacciones químicas*. Reverte.
- Lim, S.J., Kim, T.-H., 2014. Applicability and trends of anaerobic granular sludge treatment processes. *Biomass Bioenergy* 60, 189–202. doi:10.1016/j.biombioe.2013.11.011
- Lima, D.M.F., Lazaro, C.Z., Rodrigues, J.A.D., Ratusznei, S.M., Zaiat, M., 2016. Optimization performance of an AnSBBR applied to biohydrogen production treating whey. *J. Environ. Manage.* 169, 191–201. doi:10.1016/j.jenvman.2015.12.032
- Liu, Y., Tay, J.-H., 2002. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Res.* 36, 1653–1665. doi:10.1016/S0043-1354(01)00379-7
- Liu, Y., Xu, H.-L., Yang, S.-F., Tay, J.-H., 2003. Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Res.* 37, 661–673.
- Momirlan, M., Veziroglu, T.N., 2002. Current status of hydrogen energy. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 6, 141–179. doi:10.1016/S1364-0321(02)00004-7
- Moo-Young, M., Blanch, H.W., 1981. Design of biochemical reactors mass transfer criteria for simple and complex systems, in: *Reactors and Reactions, Advances in Biochemical Engineering*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–69.
- Nicolella, C., Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 2000. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *J. Biotechnol.* 80, 1–33.

- Nicolella, C., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, S.J., 2000. Particle-based biofilm reactor technology. *Trends Biotechnol.* 18, 312–320. doi:10.1016/S0167-7799(00)01461-X
- Pauss, A., Andre, G., Perrier, M., Guiot, S.R., 1990. Liquid-to-Gas Mass Transfer in Anaerobic Processes: Inevitable Transfer Limitations of Methane and Hydrogen in the Biomethanation Process. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1636–1644.
- Peña, M.R., Mara, D.D., Avella, G.P., 2006. Dispersion and treatment performance analysis of an UASB reactor under different hydraulic loading rates. *Water Res.* 40, 445–452. doi:10.1016/j.watres.2005.11.021
- Peña, M.R., Mara, D.D., Avella, G.P., 2006. Dispersion and treatment performance analysis of an UASB reactor under different hydraulic loading rates. *Water Res.* 40, 445–452. doi:10.1016/j.watres.2005.11.021
- Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Fontes Lima, D.M., Borzacconi, L., Varesche, M.B., Zaiat, M., Etchebehere, C., 2013. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *Int. J. Hydrog. Energy, European Fuel Cell* 2011 38, 54–62. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.10.022
- Pomeón, T., Cervantes-Escoto, F., 2010. El sector lechero y quesero en México de 1990 a 2009: Entre lo global y local.
- Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J., 2012. Cheese whey management: A review. *J. Environ. Manage.* 110, 48–68. doi:10.1016/j.jenvman.2012.05.018
- Reible, D.D., 1998. *Fundamentals of Environmental Engineering*. CRC Press.
- Ren, T.-T., Mu, Y., Ni, B.-J., Yu, H.-Q., 2009. Hydrodynamics of upflow anaerobic sludge blanket reactors. *AIChE J.* 55, 516–528. doi:10.1002/aic.11667
- Ruggeri, B., Tommasi, T., Sanfilippo, S., 2015a. *BioH₂ & BioCH₄ Through Anaerobic Digestion, Green Energy and Technology*. Springer London, London.
- Ruggeri, B., Tommasi, T., Sanfilippo, S., 2015b. *BioH₂ & BioCH₄ Through Anaerobic Digestion, Green Energy and Technology*. Springer London, London.
- Saleh, M.M., Mahmood, U.F., 2003. UASB/EGSB applications for industrial wastewater treatment, in: *Seventh International Water Technology Conference, Egypt*. Citeseer.
- Shell Global, 2016. Shell to install nationwide network of hydrogen vehicle fuelling pumps in Germany [WWW Document]. URL <http://www.shell.com/media/news-and-media-releases/2015/shell-to-install-nationwide-network-hydrogen-vehicle-fuelling-pumps-germany.html> (accessed 8.17.16).
- Sherif, S.A., Goswami, D.Y., Stefanakos, E.K. (Lee), Steinfeld, A., 2014. *Handbook of Hydrogen Energy*. CRC Press.
- Show, K.Y., Lee, D.J., Tay, J.H., Lin, C.Y., Chang, J.S., 2012. Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. *Int. J. Hydrog. Energy, The 2011 Asian Bio-Hydrogen and Biorefinery Symposium (2011ABBS)* 37, 15616–15631. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.04.109
- Stewart, P.S., 2003. Diffusion in Biofilms. *J. Bacteriol.* 185, 1485–1491. doi:10.1128/JB.185.5.1485-1491.2003

- Tavares, T., Malcata, F.X., 2016. Whey and Whey Powders: Fermentation of Whey, in: *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, pp. 486–492.
- Tay, J.-H., Xu, H.-L., Teo, K.-C., 2000. Molecular Mechanism of Granulation. I: H+ Translocation-Dehydration Theory. *J. Environ. Eng.* 126, 403–410. doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(2000)126:5(403)
- Ueno, Y., Otsuka, S., Morimoto, M., 1996. Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture. *J. Ferment. Bioeng.* 82, 194–197. doi:10.1016/0922-338X(96)85050-1
- Valdez-Vazquez, I., Poggi-Varaldo, H.M., 2009. Alkalinity and high total solids affecting H₂ production from organic solid waste by anaerobic consortia. *Int. J. Hydrog. Energy* 34, 3639–3646. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.02.039
- Venetsaneas, N., Antonopoulou, G., Stamatelatos, K., Kornaros, M., Lyberatos, G., 2009a. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresour. Technol.*, Second International Conference on Engineering for Waste Valorisation (WasteEng2008 100, 3713–3717. doi:10.1016/j.biortech.2009.01.025
- Venetsaneas, N., Antonopoulou, G., Stamatelatos, K., Kornaros, M., Lyberatos, G., 2009b. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresour. Technol.* 100, 3713–3717. doi:10.1016/j.biortech.2009.01.025
- Waid, M., 1995. *Flash: Terminal Velocity*. DC Comics, New York, NY.
- Wang, L., Zhou, Q., Li, F., 2006. Avoiding propionic acid accumulation in the anaerobic process for biohydrogen production. *Biomass Bioenergy* 30, 177–182. doi:10.1016/j.biombioe.2005.11.010
- Welty, J., Wicks, C.E., Rorrer, G.L., Wilson, R.E., 2007. *Fundamentals of Momentum, Heat and Mass Transfer*, 5 edition. ed. Wiley, Danver, MA.
- Welty, J.R. (Ed.), 2008. *Fundamentals of momentum, heat, and mass transfer*, 5th ed. ed. Wiley, Danver, MA.
- Wu, B., 2013. Advances in the use of CFD to characterize, design and optimize bioenergy systems. *Comput. Electron. Agric.* 93, 195–208. doi:10.1016/j.compag.2012.05.008
- Wu, J., Bi, L., Zhang, J.B., Poncin, S., Cao, Z.P., Li, H.Z., 2012a. Effects of increase modes of shear force on granule disruption in upflow anaerobic reactors. *Water Res.* 46, 3189–3196. doi:10.1016/j.watres.2012.03.042
- Wu, J., Bi, L., Zhang, J.B., Poncin, S., Cao, Z.P., Li, H.Z., 2012b. Effects of increase modes of shear force on granule disruption in upflow anaerobic reactors. *Water Res.* 46, 3189–3196. doi:10.1016/j.watres.2012.03.042
- Wu, S.-Y., Chu, C.-Y., Yeh, W.-Z., 2013. Aspect ratio effect of bioreactor on fermentative hydrogen production with immobilized sludge. *Int. J. Hydrog. Energy* 38, 6154–6160. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.01.108
- Wu, S.-Y., Hung, C.-H., Lin, C.-N., Chen, H.-W., Lee, A.-S., Chang, J.-S., 2006. Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 93, 934–946. doi:10.1002/bit.20800

- Wu, S.-Y., Lin, C.-N., Chang, J.-S., Chang, J.-S., 2005. Biohydrogen production with anaerobic sludge immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer. *Int. J. Hydrog. Energy* 30, 1375–1381. doi:10.1016/j.ijhydene.2004.09.011
- Wu, W., Hickey, R.F., Zeikus, J.G., 1991. Characterization of metabolic performance of methanogenic granules treating brewery wastewater: role of sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3438–3449.
- Yang, J., Yang, Y., Ji, X., Chen, Y., Guo, J., Fang, F., 2015. Three-Dimensional Modeling of Hydrodynamics and Biokinetics in EGSB Reactor. *J. Chem.* 501, 635281.
- Yang, P., Zhang, R., McGarvey, J.A., Benemann, J.R., 2007. Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *Int. J. Hydrog. Energy* 32, 4761–4771. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.07.038
- Zeng, Y., Mu, S.J., Lou, S.J., Tartakovsky, B., Guiot, S.R., Wu, P., 2005. Hydraulic modeling and axial dispersion analysis of UASB reactor. *Biochem. Eng. J.* 25, 113–123. doi:10.1016/j.bej.2005.04.024
- Zhang, M.-L., Fan, Y.-T., Xing, Y., Pan, C.-M., Zhang, G.-S., Lay, J.-J., 2007. Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. *Biomass Bioenergy* 31, 250–254. doi:10.1016/j.biombioe.2006.08.004
- Zhang, Z.-P., Show, K.-Y., Tay, J.-H., Liang, D.T., Lee, D.-J., Jiang, W.-J., 2006. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochem.* 41, 2118–2123. doi:10.1016/j.procbio.2006.05.021
- Zhou, X., Nanqi, R., 2007. Acid resistance of methanogenic bacteria in a two-stage anaerobic process treating high concentration methanol wastewater. *Front. Environ. Sci. Eng. China* 1, 53–56. doi:10.1007/s11783-007-0010-8