



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.



**“PRODUCCIÓN DE BIOGÁS EN CONTINUO MEDIANTE EL
ACOPLAMIENTO DE REACTORES TIPO CSTR Y UASB PARA LA
OBTENCIÓN DE HIDRÓGENO Y METANO COMO ACARREADORES DE
ENERGÍA A TRAVÉS DEL APROVECHAMIENTO DE VINAZAS
TEQUILERAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA

PRESENTA

IBT. YERANNY GOVEA PAZ

COMITÉ TUTORIAL

DR. ÓSCAR AGUILAR JUÁREZ

DR. LUIS ALBERTO ARELLANO GARCÍA

DRA. ILIANA DEL CARMEN BARRERA MARTÍNEZ

DR. ENRIQUE JAIME HERRERA LÓPEZ

Guadalajara, Jalisco. Agosto, 2021



**GOBIERNO DE
MÉXICO**



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Guadalajara, Jalisco, a 16 de agosto de 2021
CP/938/2021

YERANNY GOVEA PAZ

ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA
NÚMERO DE MATRÍCULA 1803MB6404
PRESENTE

Por este medio le informo que el trabajo de tesis **"Producción de biogás en continuo mediante el acoplamiento de reactores tipo CSTR y UASB para la obtención de hidrógeno y metano como acarreadores de energía a través del aprovechamiento de vinazas tequileras"** desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dr. Oscar Aguilar Juárez. Director de tesis
Dr. Luis Alberto Arellano García Co-director de tesis
Dra. Iliana del Carmen Barrera Martínez. Asesora de tesis
Dr. Enrique Jaime Herrera López. Asesor de tesis

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Innovación Biotecnológica.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Mtra. Fátima Gabriela Ordóñez de la Cruz
Coordinadora de Posgrados



Guadalajara, Jalisco a 28 de Julio de 2021

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial de la estudiante **Yeranny Govea Paz**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “PRODUCCIÓN DE BIOGÁS EN CONTINUO MEDIANTE EL ACOPLAMIENTO DE REACTORES TIPO CSTR Y UASB PARA LA OBTENCIÓN DE HIDRÓGENO Y METANO COMO ACARREADORES DE ENERGÍA A TRAVÉS DEL APROVECHAMIENTO DE VINAZAS TEQUILERAS” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la estudiante para aspirar al grado de Maestra en Ciencias en Innovación Biotecnológica con opción terminal en Tecnología Ambiental durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 28 del mes de julio del año dos mil veintiuno.



Dr. Óscar Aguilar Juárez
Director de tesis/tutor académico



Dr. Luis Alberto Arellano García
Co-director de tesis/tutor en planta



Dra. Iliana Del Carmen Barrera Martínez
Asesora



Dr. Enrique Jaime Herrera López
Asesor

“Un científico en su laboratorio
no es sólo un técnico: es también
un niño colocado ante fenómenos
naturales que le impresionan
como un cuento de hadas”

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

A CIATEJ, por abrirme las puertas de la institución y por ser parte de mi formación profesional.

A CONACyt, por concederme la beca con CVU 914047, por fomentar el desarrollo de la ciencia en México y por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo a través del Proyecto No. 1214 “Utilización de efluentes agroindustriales para la producción continua de acarreadores de energía sustentable: un estudio de prospección y optimización”.

Al Dr. Óscar Aguilar Juárez, por brindarme la oportunidad de colaborar en su equipo de trabajo, por todas las facilidades y el apoyo que me proporcionó durante el desarrollo experimental, por las enseñanzas y por el tiempo invertido en la dirección de la presente tesis.

Al Dr. Luis A. Arellano García, a la Dra. Iliana del Carmen Barrera Martínez y al Dr. Enrique J. Herrera López, miembros del comité tutorial, cuyas aportaciones fueron muy valiosas a lo largo de estos años y contribuyeron al enriquecimiento de mi desarrollo académico.

A mi equipo de trabajo de laboratorio: Jesús, Roberto y Luis, quienes colaboraron para hacer todo esto posible, estuvieron en cada momento y aportaron mucho a mi vida, tanto personal como académicamente.

A mis padres y a mi hermano, pilares fundamentales en mi vida, por el ejemplo que representan para mí, por el apoyo, por los consejos, por impulsarme para alcanzar las metas planteadas y por alentarme a pesar de los obstáculos que se presenten.

A esas personas que se convirtieron en amigos incondicionales, por las enseñanzas, por escucharme, apoyarme, brindarme un consejo, hacerme reír cada vez que atravesaba un mal momento, por ser la compañía perfecta en situaciones difíciles, por animarme y por permitirme ser parte de sus vidas: Elda, Andrea, Iliany, Alely, Jonhatan y David. Son parte importante de esta aventura, ¡infinitas gracias por toda la paciencia!

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XV
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	XVI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. Aprovechamiento de residuos agroindustriales.....	2
2.2. La industria tequilera y sus residuos	4
2.2.1. Vinazas tequileras.....	7
2.3. Revalorización de vinazas.....	8
2.3.1. Obtención de biocombustibles a través de la digestión anaerobia.....	10
2.3.1.1. Hidrógeno	13
2.3.1.2. Metano.....	14
2.4. Reactor de Tanque Agitado Flujo Continuo (CSTR)	15
2.5. Reactor Anaerobio de Manto de Lodos de Flujo Ascendente (UASB)	15
2.6. Acoplamiento de reactores para producción en continuo.....	17
2.7. Uso de soportes (carriers) para la inmovilización microbiana en la producción de hidrógeno	18
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
4. JUSTIFICACIÓN.....	21
5. HIPÓTESIS	21
6. OBJETIVOS	22
6.1. Objetivo general	22
6.2. Objetivos específicos	22
7. MATERIALES Y MÉTODOS	23
7.1. Muestreo y caracterización de vinazas tequileras	23
7.2. Caracterización del inóculo	24
7.3. Diseño de reactores	24
7.4. Montaje de sistema de reactores en continuo y en serie	26
7.4.1. Reactor CSTR: producción de biohidrógeno.....	26
7.4.2. Reactor UASB: producción de biometano.....	28
7.5. Arranque de reactores y cambio de concentración orgánica de vinaza de alimentación	30
7.6. Toma de muestras del reactor CSTR y del reactor UASB.....	31

7.6. Métodos analíticos	32
7.6.1. Análisis de DQO, azúcares totales, azúcares reductores y fenoles totales presentes en muestras extraídas del efluente del reactor CSTR.....	32
7.6.2. Análisis de DQO en muestras extraídas del efluente del reactor UASB	32
7.6.3. Análisis de composición gaseosa del biogás contenido en muestras extraídas de ambos reactores	32
7.7. Cálculo de la producción de energía en cada reactor	33
7.8 Métodos estadísticos.....	35
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
8.1. Caracterización de vinaza	36
8.2. Producción de biogás en reactor CSTR	38
8.2.1. Composición gaseosa en reactor CSTR	43
8.2.2. Producción volumétrica de hidrógeno en reactor CSTR	45
8.2.3. Perfil de comunidad bacteriana en CSTR	49
8.2.4. Producción de energía en reactor CSTR	53
8.2.5. Contenido de azúcares totales y azúcares reductores presentes en vinaza y en muestras extraídas del reactor CSTR	54
8.2.5.1. Azúcares totales	54
8.2.5.2. Azúcares reductores	57
8.3. Producción de biogás en reactor UASB	60
8.3.1. Composición gaseosa en reactor UASB	63
8.3.2. Producción volumétrica de metano en reactor UASB	67
8.3.3. Perfil de comunidad bacteriana en UASB	71
8.3.4. Producción de energía en reactor UASB	73
8.4. Producción de biogás en el sistema de reactores	74
8.4.1. Producción de energía total	77
8.5. Remoción de fenoles totales y de materia orgánica (DQO)	79
8.5.1. Fenoles totales.....	80
8.5.2. Cuantificación de DQO en ambos reactores	83
9. CONCLUSIONES	88
10. PROSPECTIVAS.....	89
11. BIBLIOGRAFÍA.....	90
12. ANEXOS.....	99
12.1. Técnicas de caracterización fisicoquímica	99
12.1.1. Demanda Química de Oxígeno.....	99

12.1.1.1. Materiales, reactivos y equipo	99
12.1.1.2. Procedimiento	99
12.1.2. pH	100
12.1.3. Determinación de Azúcares Totales	100
12.1.3.1. Materiales, reactivos y equipo	100
12.1.3.2. Procedimiento	100
12.1.4. Azúcares reductores	101
12.1.4.1. Materiales, reactivos y equipo	101
12.1.4.2. Procedimiento	102
12.1.5. Fenoles totales por 4- aminoantipirina	102
12.1.5.1. Materiales, reactivos y equipo	103
12.1.5.2. Procedimiento	103
12.1.6. Nitrógeno Total.....	104
12.1.6.1. Materiales, reactivos y equipo	104
12.1.6.2. Procedimiento	104
12.1.7. Fósforo Total	105
12.1.7.1. Materiales, reactivos y equipo	105
12.1.7.2. Procedimiento	106
12.1.8. Carbono Orgánico Total (COT)	106
12.1.9. Sólidos Totales (ST).....	107
12.1.9.1. Materiales y equipo.....	107
12.1.9.2. Procedimiento	107
12.1.10. Sólidos Totales Volátiles (STV).....	108
12.1.10.1. Materiales y equipo.....	108
12.1.10.2. Procedimiento	108
12.2. Curvas de calibración utilizadas para la caracterización de vinaza	109
12.2.1. Curvas de calibración para azúcares totales.....	109
12.2.2. Curvas de calibración para azúcares reductores	111
12.2.3. Curvas de calibración para fenoles totales	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del proceso de elaboración del tequila	5
Figura 2. Mapa conceptual sobre las alternativas para el tratamiento de vinazas	9
Figura 3. Diagrama del proceso de digestión anaerobia.....	13
Figura 4. Modelo de a) reactor CSTR y b) reactor UASB. Medidas (SI): centímetros	25
Figura 5. Fotografía del arreglo del reactor CSTR: 1. Contenedor de vinaza de alimentación, 2. Manguera de alimentación, 3. Manguera para la adición de álcali, 4. Conexión del espacio de cabeza del reactor hacia el μ Flow®, 5. Sensores,.....	26
Figura 6. Fotografía del arreglo del reactor UASB: 1. Manguera de alimentación, 2. Toma de muestras microbiológicas, 3. Conexión de chaqueta hidráulica, 4. Tubería de salida del efluente, 5. Conexión del espacio de cabeza del reactor hacia el μ Flow®	29
Figura 7. Fotografía del acoplamiento de reactores CSTR y UASB en el laboratorio.....	30
Figura 8. Gráfico de la producción de biogás en el reactor CSTR durante la fermentación de vinaza tequilera a diferentes cargas orgánicas.....	40
Figura 9. Gráfico de análisis ANOVA simple: efecto de la concentración de DQO de la vinaza de alimentación sobre el volumen de biogás producido en el reactor CSTR. Letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los grupos (LSD $p \leq 0.05$)	41
Figura 10. Gráfico de la composición gaseosa de muestras extraídas diariamente del reactor CSTR.....	43
Figura 11. Gráfico de la composición porcentual (por etapa) del biogás generado dentro del reactor CSTR.....	44
Figura 12. Gráfico de producción volumétrica de biogás en reactor CSTR respecto al tiempo de duración del experimento	45
Figura 13. Gráfico del volumen promedio de biogás (H_2 y CH_4) en función de la carga orgánica volumétrica en el reactor CSTR.....	49
Figura 14. Gráfico de la abundancia relativa de los microorganismos identificados en la biopelícula formada en los carriers dentro del CSTR durante cada etapa experimental.	50
Figura 15. Gráfico de la producción de energía generada en el reactor CSTR	53
Figura 16. Gráfico de la relación entre el contenido de azúcares totales presentes en vinaza y en las muestras extraídas del reactor CSTR	56

Figura 17. Gráfico de la relación entre el contenido de azúcares reductores presentes en vinaza y en las muestras extraídas del reactor CSTR	58
Figura 18. Gráfico de los resultados de la concentración de azúcares totales y azúcares reductores presentes en muestras extraídas del reactor CSTR	59
Figura 19. Gráfico de la producción de biogás en el reactor UASB durante la fermentación de vinaza tequilera a diferentes cargas orgánicas.....	61
Figura 20. Gráfico de análisis ANOVA simple: efecto de la concentración de DQO de la vinaza de alimentación sobre el volumen de biogás producido en el reactor UASB. Letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los grupos (LSD $p \leq 0.05$)	62
Figura 21. Gráfico de la composición gaseosa de muestras extraídas diariamente del reactor UASB.....	64
Figura 22. Gráfico de la composición porcentual (por etapa) del biogás generado dentro del reactor UASB.....	65
Figura 23. Fotografías del lodo anaerobio granular, correspondientes con las etapas experimentales V y VI.....	66
Figura 24. Gráfico de la producción volumétrica de biogás en el reactor UASB respecto al tiempo de duración del experimento.....	67
Figura 25. Gráfico del volumen promedio de biogás (H_2 y CH_4) en función de la carga orgánica volumétrica en el reactor UASB.....	70
Figura 26. Gráfico de la abundancia relativa de los microorganismos del lodo anaerobio granular identificados en cada etapa experimental. Modificado de Muñoz-Estrada, 2021	72
Figura 27. Gráfico de la producción de energía generada en el reactor UASB	73
Figura 28. Gráfico de la producción de biogás generado en el sistema de reactores durante los tres meses de duración del experimento	75
Figura 29. Gráfico de la producción de energía generada en el sistema de reactores.....	77
Figura 30. Gráfico de la relación entre el contenido de fenoles totales presentes en vinaza y en las muestras extraídas del reactor CSTR	81
Figura 31. Gráfico de la concentración de DQO en vinaza de alimentación y en muestras extraídas de ambos reactores	84
Figura 32. Gráfico del porcentaje de remoción de DQO en los reactores CSTR y UASB durante las diferentes etapas del experimento	85

Figura 33. Curvas de calibración para glucosa. Determinación de azúcares totales para caracterización de vinaza	109
Figura 34. Curvas de calibración para glucosa. Determinación de azúcares totales para caracterización de vinaza (continuación).....	110
Figura 35. Curvas de calibración para glucosa. Determinación de azúcares reductores para caracterización de vinaza	111
Figura 36. Curvas de calibración para ácido gálico. Determinación de fenoles totales para caracterización de vinaza	112
Figura 37. Curva de calibración para ácido gálico. Determinación de fenoles totales para caracterización de vinaza (continuación).....	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Alternativas en el aprovechamiento de residuos agroindustriales.....	3
Tabla 2. Parámetros y métodos utilizados para la caracterización de vinaza	23
Tabla 3. Resultados de caracterización de los lotes de vinaza utilizados en este estudio	36
Tabla 4. Registro del volumen acumulado de biogás producido en el reactor CSTR durante cada etapa del experimento de fermentación de vinaza	39
Tabla 5. Media de la energía producida en el reactor CSTR en relación con los diferentes valores de carga orgánica volumétrica empleados.....	53
Tabla 6. Concentración teórica de azúcares totales a la entrada del sistema de reactores durante cada etapa experimental	55
Tabla 7. Concentración teórica de azúcares reductores a la entrada del sistema de reactores durante cada etapa experimental	57
Tabla 8. Registro del volumen acumulado de biogás producido en el reactor UASB durante cada etapa del experimento de fermentación de vinaza	60
Tabla 9. Media de la energía producida en el reactor UASB en relación con los diferentes valores de carga orgánica volumétrica empleados.....	73
Tabla 10. Registro del volumen acumulado de biogás producido en el sistema de reactores durante cada etapa del experimento	75
Tabla 11. Media de la energía total producida en el sistema de reactores	77
Tabla 12. Concentración teórica de fenoles totales a la entrada del sistema de reactores durante cada etapa experimental	80

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Cálculo del volumen del biogás generado por día	33
Ecuación 2. Cálculo de la producción volumétrica del gas de interés en función del volumen del reactor	33
Ecuación 3. Cálculo de la producción volumétrica total del biogás en función del volumen del reactor	34
Ecuación 4. Fórmula de la Ley de los Gases Ideales.....	34
Ecuación 5. Cálculo de la producción volumétrica del número de moles del biogás.....	34
Ecuación 6. Cálculo de la producción de energía	35
Ecuación 7. Cálculo de la producción de energía total del sistema.....	35
Ecuación 8. Fórmula para calcular la concentración de Sólidos Totales.....	107
Ecuación 9. Fórmula para calcular la concentración de Sólidos Totales Volátiles	108

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la generación de residuos por parte de las industrias ha ido en aumento considerable, hecho ligado de manera directa con el incremento de la población mundial ya que, al mismo tiempo, el consumismo es mayor y, por ende, se requiere acrecentar la manufactura de diversos productos, situación que conlleva serias consecuencias, sobre todo, en cuestión ambiental debido a que la mayoría de las veces estos residuos no cuentan con una disposición adecuada.

Atendiendo a esta problemática que perjudica no sólo a la población de flora y fauna del ecosistema afectado sino que también representa un posible foco de infección para las personas que están en contacto con él, se han desarrollado tecnologías alternativas que buscan disminuir la magna cantidad de residuos que se generan día con día mediante su aprovechamiento en otros rubros como en el compostaje, en la elaboración de subproductos industriales y de biopolímeros, en la recuperación de medios abióticos contaminados y en la producción de energías renovables y biocombustibles; haciendo especial énfasis en esta última ya que, al ser una vía prometedora de obtención de energía para el futuro, muchas líneas de investigación apuntan hacia ella.

En México, una de las industrias con mayor demanda y, a la vez, generadora de gran cantidad de residuos es la tequilera, de donde derivan el bagazo y las vinazas, principalmente. Se ha estudiado la producción de biocombustibles como el metano y el hidrógeno a partir de estas últimas con el fin de reducir el impacto que tienen sobre cuerpos de agua; para ello, es necesario utilizar un sistema que garantice la mayor producción de éstos en un tiempo relativamente considerable y el uso de reactores de tanque agitado en continuo resulta una opción muy llamativa para conseguirlo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Aprovechamiento de residuos agroindustriales

El mundo actual exige una mayor demanda de insumos, consecuencia directa del constante y acelerado crecimiento que ha tenido la población desde comienzos del siglo XXI. En este sentido, la agroindustria juega un rol importante ya que se encarga de combinar actividades primarias y manufactureras destinadas a la producción de alimentos y de materias primas semielaboradas que satisfacen las necesidades del ser humano (Vargas & Pérez, 2018).

Al representar un sector económico, la agroindustria debe asegurar un desarrollo sostenible mediante el compromiso social de fomentar un equilibrio entre el desarrollo productivo y los impactos generados en el medio ambiente, derivados del mal manejo de los residuos que se originan de los diferentes procesos previos al producto terminado y que, generalmente, tienen una disposición final inadecuada. En la mayoría de los casos, este mal manejo se debe a factores como las pocas alternativas económicas y sociales, además del desconocimiento de métodos apropiados para el aprovechamiento de los residuos y de la falta de concientización por el cuidado y la protección del planeta (Cury et al., 2017; Peñaranda et al., 2017; Vargas & Pérez, 2018).

Aproximadamente, se producen alrededor de 155 billones t/año de materia orgánica pero sólo una mínima fracción puede ser consumida directamente por seres vivos obteniendo como resultado excesivas cantidades de residuos agroindustriales: se estima que, del total de alimentos destinados al consumo humano, una tercera parte corresponde a desechos (Cury et al., 2017; Peñaranda et al., 2017).

La necesidad de brindar un segundo uso a residuos agroindustriales se ha vuelto foco de interés para el despliegue de diferentes investigaciones asociadas con su aprovechamiento en otras actividades o para el desarrollo de otros productos promoviendo así la disminución del uso de recursos naturales renovables y no renovables como materia prima (Vargas & Pérez, 2018)

Al saber utilizar benéficamente las características y propiedades de los distintos residuos, se pueden obtener materiales útiles para otros procesos a través del uso de distintas tecnologías (Vargas & Pérez, 2018):

- a) *Valorización biológica y química*: obtención de gases, líquidos o sólidos (pectinas, enzimas, aceites esenciales) que pueden ser comercializables utilizando procesos biológicos como compostaje y lombricultura
- b) *Obtención de combustibles*
- c) *Valorización térmica*: busca la reducción del volumen de los residuos y la recuperación de energía a partir de éstos mediante procesos como incineración y pirólisis

El destino de aprovechamiento de los residuos dependerá directamente de su procedencia y composición; asimismo, es necesario considerar la cantidad que se genera inicialmente y la que se produce después de reusarlo ya que, aunque sea en pequeñas cantidades, habrá un siguiente residuo que puede tener otra aplicación o convertirse en un desecho. En la **Tabla 1**, se presentan las diferentes alternativas de reutilización (Cury et al., 2017; Peñaranda et al., 2017; Vargas & Pérez, 2018).

Tabla 1. *Alternativas en el aprovechamiento de residuos agroindustriales*

Biocombustibles	Compostaje	Elaboración de otros productos de interés
Considerados una estrategia energética sustentable: bioetanol, biodiesel, biomasa, biogás	Supone una solución a la demanda de materia orgánica y costos de fertilizantes, renueva los ciclos ecológicos	Ecológicamente amigables y con un valor agregado, similares a los comerciales: pigmentos, bloques de concreto, papel, polímeros, alimentos para animales
Recuperación de medios abióticos contaminados		
Adsorción de contaminantes textiles presentes en fuentes hídricas		
Remoción de metales pesados		
Enmiendas y texturizantes del suelo que representan una fuente de carbono para microorganismos ligninolíticos que degradan hidrocarburos		

Haciendo especial hincapié en la vía bioenergética, es importante señalar que el tipo de biocombustible obtenido depende directamente del estado del residuo: a partir de la gasificación de residuos sólidos, se obtiene calor y electricidad mientras que, por otro lado, la generación de etanol y biodiesel se hace posible gracias al uso de residuos líquidos, producto de cultivos energéticos tales como caña de azúcar, oleaginosas, entre otros (Vargas & Pérez, 2018)

2.2. La industria tequilera y sus residuos

Más allá de la reciente popularidad que ha cobrado el tequila debido a la apreciación y al reconocimiento no sólo de propios sino de consumidores extranjeros, existe un gran marco histórico y artesanal que envuelve la creación de dicha bebida convirtiéndola en una de las más emblemáticas de nuestro país.

El agave (planta xerófila que crece en zonas áridas y cálidas) es la materia prima utilizada para la producción del tequila y, aunque en México se encuentran alrededor de 200 especies diferentes, únicamente el género *Agave tequilana* Weber var. azul es utilizado para este fin. Dicho agave resulta ser el más apropiado debido a la alta concentración de inulina (carbohidrato susceptible de ser transformado en fructosa y glucosa) que posee aunado a su bajo contenido de fibra y a la presencia de determinados componentes químicos que contribuyen al sabor característico de la bebida. (Bautista et al, 2001b; Cedeño, M., 1995).

Debido a su Denominación de Origen, esta planta sólo puede ser cultivada en el estado de Jalisco (mayor productor, 90%) y en algunos municipios de Michoacán, Guanajuato, Nayarit y Tamaulipas (El Universal, 2018). Se distingue por ser un cultivo perenne con un ciclo de vida de, al menos, 6 años antes de ser cosechado. La “piña” o cabeza de agave es la parte central de la planta que se utiliza como fuente de azúcares fermentables para la producción del tequila, comprende el tallo verdadero y un pequeño segmento basal de las hojas que permanecen adheridas a éste después de la cosecha; generalmente, su peso ronda entre los 20 y 60 kg aunque, algunas veces, puede llegar a pesar hasta 100 kg (Cedeño, 1995; Núñez et al., 2011; Villanueva-Rodríguez et al., 2016).

En la **Figura 1**, se presenta un esquema en el que se despliega, a grandes rasgos, el proceso de elaboración del tequila (Bautista et al., 2001b; Cedeño, 1995; López-López et al., 2010; Villanueva-Rodríguez et al., 2016).

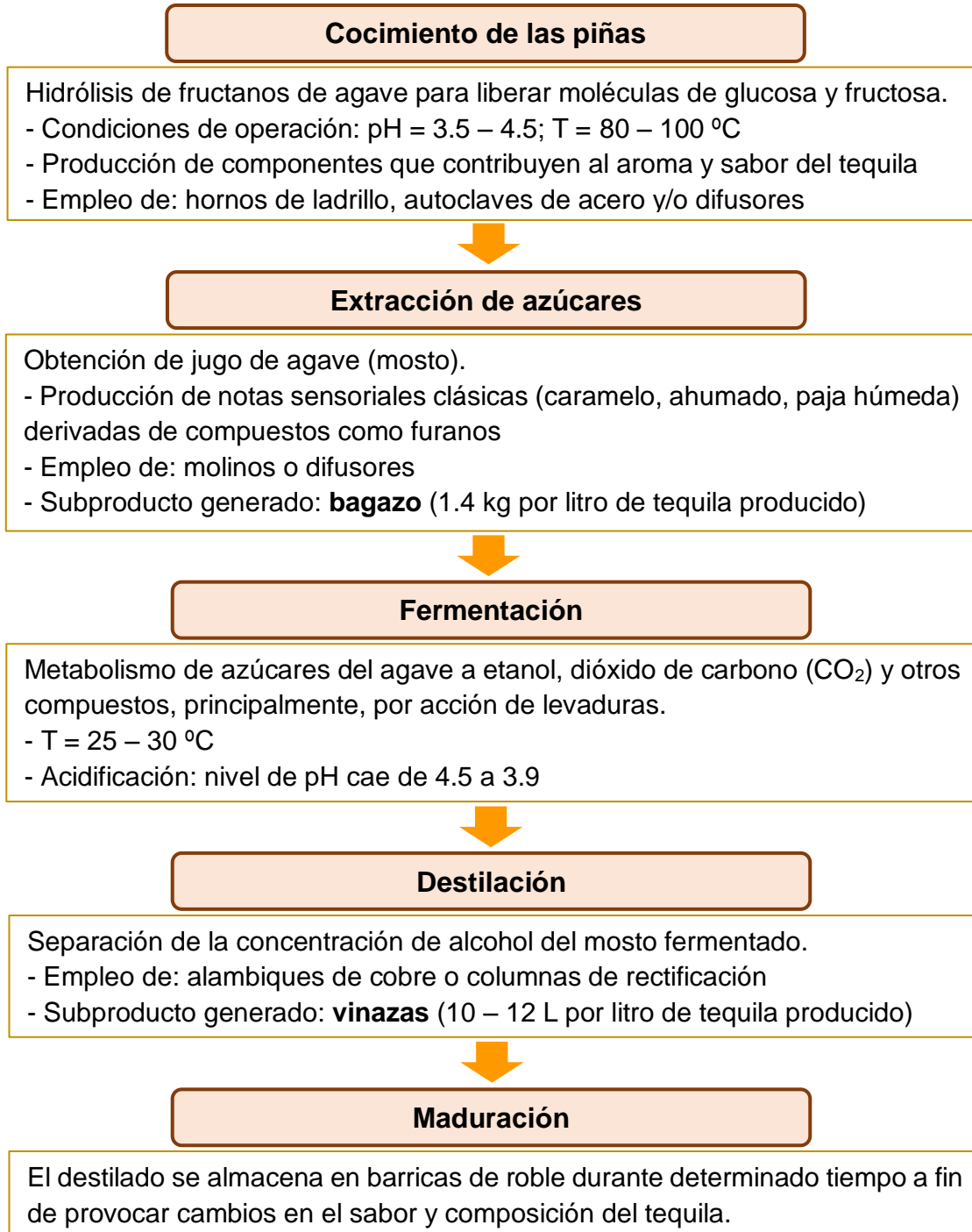


Figura 1. Esquema del proceso de elaboración del tequila

Además del agave, es posible utilizar otras fuentes que contengan azúcares fermentables tales como caña de azúcar, piloncillo, melazas de caña y jarabe de maíz, dando lugar a dos tipos de tequila: 100% y tequila, a este último se le adiciona hasta un 49% de otros azúcares (Bautista et al., 2001b; Cedeño, 1995).

En los últimos años, la industria tequilera ha tenido un crecimiento significativo gracias a que son cada vez más los países en los que el producto es consumido, siendo Estados Unidos el principal destino de exportaciones (82%), seguido de Alemania, España, Francia, Reino Unido, entre otros (Milenio, 2019).

La apertura de nuevas puertas en el mercado supone un incremento comercial que propicia las relaciones internacionales y favorece el desarrollo de la economía en México; por tanto, al tener una alta demanda, la producción del tequila también debe aumentar. De acuerdo a datos reportados por el Consejo Regulador del Tequila (CRT), organismo que se encarga de promover la cultura y calidad de dicha bebida, durante el 2019 hubo una producción de 351.7 millones de litros, siendo el número más alto reportado hasta la fecha (Consejo Regulador del Tequila, 2021).

Para 2020, la industria del tequila pretendía sobrepasar su propio récord, meta que parecía ir por buen camino pese a la actual crisis sanitaria que enfrentamos ya que, inesperadamente, este sector se vio beneficiado: durante el confinamiento, las ventas hacia Estados Unidos se dispararon 60% en comparación con el periodo marzo – abril, 2019 (Milenio, 2020). Como resultado, durante el primer semestre del 2020, la producción de tequila osciló alrededor de 189 millones de litros, cantidad que, prácticamente, se duplicó hacia finales del año, alcanzando un total de 374 millones de litros de tequila (Consejo Regulador del Tequila, 2021).

Lamentablemente, la realización de cualquier actividad agroindustrial implica la generación de residuos y la industria tequilera no es la excepción. Los principales desechos que se producen son bagazo, sólido que deriva de la extracción del jugo de las cabezas de agave cocidas, y vinazas, líquido que se origina después de la destilación y que permanece en el fondo del alambique (López-López et al., 2010).

De acuerdo con la información sobre la producción de tequila en 2020, se estima que la cuantificación de desechos generados supera la cifra de 523.5 millones de kilogramos de bagazo y asciende hasta 4 488 millones de litros de vinazas, cantidades impresionantes que reflejan la importancia de la realización de estrategias adecuadas para su posterior aprovechamiento.

2.2.1. Vinazas tequileras

Principalmente, consisten en desechos de destilería, pero componentes minoritarios como efluentes de limpieza del fermentador, condensados y agua de enfriamiento también contribuyen al volumen del efluente y a la variabilidad de la carga. Se caracterizan por (Arreola-Vargas et al., 2016; López-López et al., 2010; Robles-González et al., 2012):

- Poseer un color café oscuro, atribuido tanto a los compuestos fenólicos (ácidos húmico y tánico) altamente recalcitrantes e inhibidores como a las melanoidinas (polímeros de alto y bajo peso molecular, productos de un conjunto de reacciones químicas que se producen a altas temperaturas entre moléculas de azúcares y de aminoácidos: reacción de Maillard)
- Tener bajo rango de pH: 3 – 5
- Contener altos niveles de materia orgánica en suspensión: concentraciones de DQO (Demanda Química de Oxígeno) y de sólidos totales (azúcares reductores, compuestos no volátiles, compuestos fenólicos y polifenólicos, sales minerales y cenizas) cuyos valores se encuentran entre 60 - 100 g/L y 25 – 50 g/L, respectivamente

Alrededor del 80% de las vinazas son descargadas directamente sobre cuerpos de agua y sobre el suelo provocando severos daños ecológicos, ya que son vertidas a altas temperaturas sin recibir un tratamiento previo. Encontrar el indicado también implica un reto puesto que es necesario considerar algunos factores, como la tasa de producción del residuo (10-12 L / L tequila), la presencia de compuestos recalcitrantes y la variabilidad de la composición que, incluso, puede detectarse de lote a lote (Arreola-Vargas et al., 2016; López-López et al., 2010).

Recientemente, numerosas investigaciones se han enfocado en la búsqueda de soluciones alternativas para el uso de las vinazas ya sea aprovechando directamente sus características o, bien, brindándoles un tratamiento adecuado a fin de aminorar el impacto ambiental que ocasionan.

2.3. Revalorización de vinazas

Actualmente, vivimos diferentes situaciones económicas, sanitarias y ambientales que convergen en el análisis y en el replanteamiento de estrategias a nivel global cuyo enfoque esté dirigido hacia una sociedad sostenible, aspecto imprescindible dentro del entorno de gestión y responsabilidad empresarial.

En este sentido, a pesar de las normas impuestas a la industria tequilera con respecto a la reducción del impacto ambiental que generan los residuos, la falta de recursos financieros y tecnológicos son el principal impedimento para que pequeñas y medianas empresas puedan establecer plantas de tratamiento adecuadas; sin embargo, es posible practicar ciertas técnicas, económicamente viables, que garanticen la disminución de los contaminantes al utilizar, por ejemplo, tanques o estanques de almacenamiento bajo condiciones ambientales consiguiendo así que descienda la temperatura a la que se encuentran las vinazas (90 a 40 °C), neutralizando el pH con hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH}_2)$) y favoreciendo la sedimentación (López-López et al., 2010).

Si bien es cierto que ningún tipo de tratamiento por sí solo garantiza la total eliminación de los compuestos contaminantes presentes en las vinazas, sí es necesaria su implementación con el propósito de que, mediante la degradación de la materia orgánica, haya lugar a la transformación de dichos compuestos en subproductos, metabolitos de interés y/o en recursos bioenergéticos. Existen dos vías de tratamiento: biológico y fisicoquímico, a partir de las cuales se desprenden distintos métodos, como puede observarse, de manera general, en la **Figura 2** (Robles-González et al., 2012).

A nivel industrial, se han establecido sistemas de tratamiento que involucran la ejecución de dos o hasta tres métodos para conseguir una mayor remoción de la carga contaminante que distingue a las vinazas tequileras. La digestión anaerobia y la oxidación avanzada han cobrado particular interés debido a la eficiencia que presentan (López-López et al., 2010).

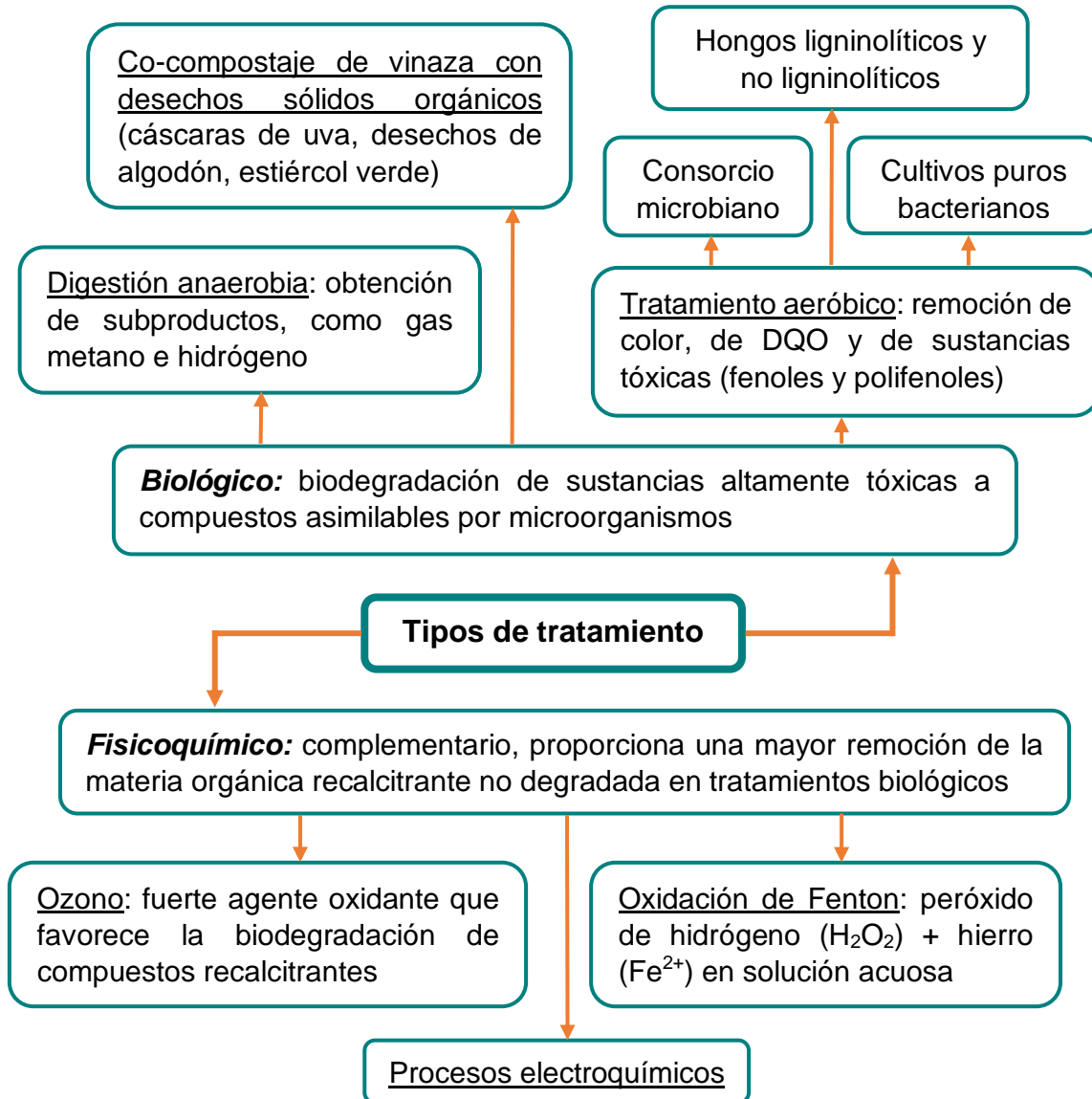


Figura 2. Mapa conceptual sobre las alternativas para el tratamiento de vinazas

Principalmente, el aprovechamiento de vinazas ha estado orientado hacia la obtención de combustibles líquidos (etano y n-butanol) y gaseosos (metano e hidrógeno) pero, en un esquema de biorrefinería más completo, también se ha considerado la producción de lacasas, peroxidasas de lignina y antioxidantes polifenólicos; no obstante, el bagazo, otro residuo de la industria tequilera, cuenta con un potencial semejante. Incluso el agave se ha posicionado como un cultivo energéticamente promisorio (Núñez et al., 2011; Pérez-Pimienta et al., 2012).

2.3.1. Obtención de biocombustibles a través de la digestión anaerobia

El acelerado ritmo de vida actual y el constante intento por cubrir las necesidades del ser humano a costa de la explotación de los recursos naturales ha conducido a una crisis alarmante que deriva en una comprometida situación, sobre todo, para el medio ambiente.

Se han realizado esfuerzos para intentar contrarrestar, en lo posible, las consecuencias del calentamiento global, un ejemplo de ello son las medidas establecidas en el Acuerdo de París 2015, donde diversos países se comprometieron a implementar las acciones necesarias para reducir las emisiones de Gases de Efecto Invernadero (United Nations Climate Change, 2020).

No obstante, la demanda social es alta y exigente, por tanto, no ha sido sencillo efectuar los lineamientos correspondientes que permitan limitar el incremento de la temperatura mundial por encima de 1.5 °C durante este siglo. En 2017, la Agencia Internacional de Energía (IEA) reportó que el total de emisiones globales ascendió a 32.8 MtCO₂ (millones de toneladas de dióxido de carbono), cifra que presentó un aumento del 1.5% con respecto al año anterior mientras que, en 2018 y en 2019, el crecimiento fue de 2.1% y 0.6%, respectivamente, siendo la quema de combustibles fósiles (petróleo, gas y carbón) la fuente más importante (El País, 2019; IEA, 2020).

El nivel de emisiones de cada país depende directamente tanto de su demografía como de las actividades económicas que ejerza, es por ello que países como China, Estados Unidos e India encabezan la lista de los más contaminantes a nivel global.

Lamentablemente, en Latinoamérica, México y Brasil también destacan en este aspecto y la apuesta actual por la industria petrolera en el primero y el aumento de la deforestación en el segundo, entorpecen cualquier intento y/o posibilidad por convertirse en países menos emisores (BBC News Mundo, 2019).

Pese a los elevados pronósticos para 2020 respecto a la emisión de CO₂, la crisis sanitaria producida por COVID-19, enfermedad infecciosa causada por un virus de la familia de los coronavirus descubierto e iniciado en China a fines de 2019, trajo como consecuencia el aislamiento social en todo el mundo debido a la rápida propagación de los casos. Esto generó un cambio drástico en muchos aspectos, especialmente en el energético ya que, basado en un índice de confinamiento, la reducción en la demanda provocó una relevante modificación en el descenso de las emisiones diarias producidas durante el primer cuatrimestre del año por un valor total de -1048 MtCO₂, equivalente a una disminución del -8.6% en relación al mismo periodo de tiempo en 2019 (Le Quéré et al., 2020).

Aunque las proyecciones estadísticas sean favorables para el decrecimiento de emisiones a finales de 2020, es necesario la asunción de responsabilidad y la participación de todos los países para la ejecución de estrategias contundentes en la lucha contra el calentamiento global a fin de revertir sus efectos e impedir mayor daño ecológico (Le Quéré et al., 2020).

Al respecto, por medio de iniciativas gubernamentales, se ha impulsado la investigación de fuentes alternativas energéticas y el desarrollo de las mismas mediante el uso de recursos renovables o el aprovechamiento de determinados residuos; al mismo tiempo, éste se ha convertido en uno de los enfoques centrales de las ciencias ambientales al intentar mitigar las consecuencias del impacto antropogénico. Bajo este escenario y en una sociedad cada vez más demandante, la adopción de un ciclo de energía limpio y libre de emisiones se vuelve una labor ineludible (Mazloomi & Gomes, 2012).

Recientemente, diversos investigadores se han inclinado por el empleo de la digestión anaerobia tanto para el tratamiento de numerosos desechos agroindustriales como para la obtención de subproductos a partir de ellos. Dicho proceso se lleva a cabo bajo condiciones en ausencia de oxígeno y, por medio de interacciones microbianas, se efectúa la descomposición de la materia orgánica para, posteriormente, ser transformada a biogás (Parra Huertas, 2016).

El biogás es un producto rico en energía -mezcla de CH_4 (metano), CO_2 y, en menor cantidad, H_2S (sulfuro de hidrógeno) y NH_3 (amoníaco)-, considerado como una fuente de energía renovable y utilizado como combustible para la co-generación de electricidad y calor (Laiq Ur Rehman et al., 2019; Parra Huertas, 2016).

La digestión anaerobia (DA) es una opción sumamente atractiva ya que, además de ser un proceso amigable con el medio ambiente, posee múltiples ventajas como los bajos costos de operación, el bajo consumo de energía, la capacidad de degradar altas cargas orgánicas, la resistencia de la biomasa a permanecer mucho tiempo en ausencia de sustrato sin perder su actividad metabólica y los bajos requerimientos nutricionales (Buitrón & Carvajal, 2009).

De acuerdo al ADM I (Digestión Anaerobia Modelo No. 1), desarrollado por la Asociación Internacional del Agua (IWA, por sus siglas en inglés), el procedimiento completo consta de cuatro etapas (**Figura 3**): hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, donde la participación de numerosos tipos de microorganismos es crucial para la producción de distintos metabolitos (Laiq Ur Rehman et al., 2019; Parra Huertas, 2016).

La diversidad microbiana así como la actividad que cada grupo desempeña, y el control de parámetros operacionales como el pH, temperatura (T), tiempo de retención hidráulica (TRH), tasa de carga orgánica y la relación carbono/nitrógeno (C/N) durante el proceso de descomposición de la materia orgánica, son factores clave en la digestión anaerobia (Laiq Ur Rehman et al., 2019).

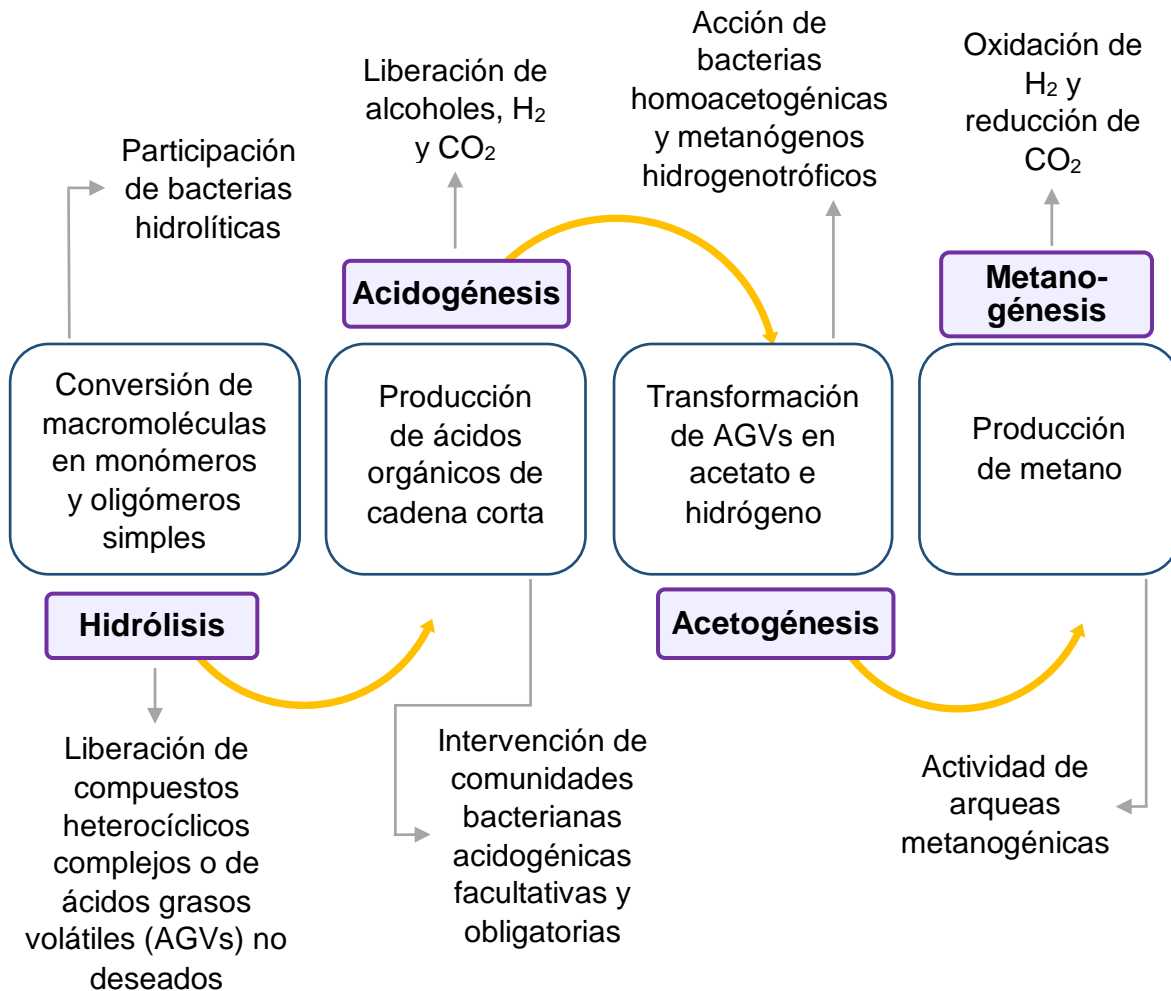


Figura 3. Diagrama del proceso de digestión anaerobia

De acuerdo a su abundancia y posterior utilidad, los principales gases de interés obtenidos son metano (CH₄), producto final de la reacción, e hidrógeno (H₂), resultado del truncamiento del proceso hasta la etapa de acetogénesis de manera tal que el sustrato no se transforme en metano (Buitrón & Carvajal, 2009)

2.3.1.1. Hidrógeno

En la búsqueda por la sustitución de fuentes de energía convencionales, el hidrógeno ha sido considerado como una valiosa alternativa al poseer una alta densidad energética, alcanzando 142 kJ/g, y al caracterizarse por no emitir contaminantes a la atmósfera, siendo vapor de agua su único producto de oxidación (Balachandar et al., 2020).

Las fuentes principales de obtención de hidrógeno son los combustibles fósiles, las energías renovables (solar e hidráulica) y los tratamientos biológicos, específicamente la digestión anaerobia. Aunque la primera represente el 97% de la cantidad total de hidrógeno generado anualmente y, económicamente, sea más factible, las otras dos ofrecen un enfoque sensible con el medio ambiente, el cual coincide con la necesidad de una nueva orientación de las políticas actuales hacia el desarrollo de un sistema que permita un equilibrio adecuado entre la sociedad y el entorno en el que se desenvuelve (Khan et al., 2018; Mazloomi & Gomes, 2012).

Dentro de un margen respetuoso tanto con los ecosistemas como con otros seres vivos y, al mismo tiempo, propicio para la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero, es válido considerar al proceso de digestión anaerobia como una alternativa viable para la producción de hidrógeno dadas las ventajas que presenta y la posibilidad de tratamiento de una amplia variedad de diferentes tipos de residuos. Aunque también es necesario superar algunos desafíos que pueden obstaculizar el proceso, tales como (Khan et al., 2018):

- Sostenibilidad en la producción a partir de diferentes sustratos debido a la variedad de composición y al contenido de carbono
- Identificación e impedimento de condiciones de inhibición: iones metálicos, pesados y ligeros, presencia de derivados de furano y de fenol, componentes de alcohol y AGVs, concentraciones altas de NH_3 y NH_4^+ (amonio)
- Optimización de parámetros que intervienen en el proceso
- Retos económicos y de seguridad relacionados con la creación de un sistema de almacenamiento a escala industrial

2.3.1.2. Metano

El metano cuenta con una densidad energética de 55.6 kJ/g y se considera como energía renovable ya que, bajo condiciones anaerobias, puede ser transformado en energía eléctrica o de calor a partir de desechos alimentarios, recursos forestales, estiércol de ganado y aguas residuales (Li et al., 2019; Mazloomi & Gomes, 2012).

El potencial de recuperación de energía varía de acuerdo al sustrato que se esté tratando; sin embargo, es posible emplear la energía calorífica obtenida en la producción de metano dentro del mismo sistema de digestión anaerobia con el propósito de mantener el nivel de temperatura adecuado, ya que éste es un factor que juega un papel importante tanto en la actividad microbiana como en la eficiencia del proceso (Li et al., 2019).

2.4. Reactor de Tanque Agitado Flujo Continuo (CSTR)

Los reactores CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor) son ampliamente utilizados a nivel industrial debido a las ventajas que presentan en cuanto a la uniformidad de la mezcla; es decir, para un tiempo determinado, variables como presión, composición y temperatura son iguales en todos los puntos del reactor. En el caso del último parámetro mencionado, es posible mantener la misma condición mediante el uso de una chaqueta térmica que permita la adecuada transferencia de calor hacia el interior del reactor (Nienow, 2014; Peña et al., 2008).

2.5. Reactor Anaerobio de Manto de Lodos de Flujo Ascendente (UASB)

Su nombre deriva de las siglas en inglés Upflow Anaerobic Sludge Blanket, cuyo equivalente en español es Reactor Anaerobio de Manto de Lodos de Flujo Ascendente (RAFA). Es ampliamente utilizado en el tratamiento anaerobio de aguas residuales debido a que presenta una baja producción de lodo, recuperación de energía en forma de biogás (metano y dióxido de carbono, principalmente), tiempos de residencia hidráulica cortos y elevados tiempos de retención de sólidos, ventajas que son altamente competitivas en comparación con procesos que se ejecutan en presencia de oxígeno (Daud et al., 2018; Márquez & Martínez, 2011; Nnaji, 2013).

Una manera de conceptualizar esquemáticamente un reactor UASB es mediante la visualización de un tanque Imhoff “al revés”, en donde la cámara de decantación y la de digestión se encuentran superpuestas. Asimismo, en la parte inferior del reactor, se localiza una biopelícula fija que no cuenta con empaque ni medio de soporte por lo que, de manera general, se pueden distinguir tres zonas bien definidas a lo largo del reactor (Lorenzo & Obaya, 2006; Márquez & Martínez, 2011):

- a) *Lecho de lodos*: concentración de los microorganismos responsables de la degradación de la materia orgánica presente en el afluente a tratar
- b) *Medía*: es en donde se encuentran dispersos los microorganismos
- c) *Separación gas – líquido – sólido*

El fundamento de su funcionamiento se basa en el flujo ascendente del afluente, el cual debe ser introducido por la parte inferior del reactor. Durante su permanencia en el mismo, atraviesa un manto de lodos formado por una comunidad microbiana que se desarrolla de manera interactiva y que, generalmente, se encuentra en forma de agregados granulares. El contacto forzado entre el lodo biológico y el agua residual da como resultado la producción de biogás, mismo que estimula la circulación al interior del reactor y que contribuye en la formación y mantenimiento de los gránulos celulares (Daud et al., 2018; Lorenzo, & Obaya, 2006).

Durante el proceso, parte del gas generado se adhiere a las partículas biológicas y tanto éste como el libre ascienden hacia una bóveda de recogida de gases, ubicada en la parte superior del reactor, en donde el gas adherido es liberado gracias a la acción de deflectores desgasificadores y las partículas desgasificadas vuelven a caer a la superficie del manto de lodos (Lorenzo & Obaya, 2006).

La eficiencia del sistema UASB está determinada por (Nnaji, 2013):

- a) Actividad de la población microbiana. Para favorecer su desempeño, es necesario mantener condiciones adecuadas de temperatura y pH (6.8 – 7.8)
- b) Velocidad y grado de granulación de la biomasa activa en el reactor. La primera determina la duración del periodo de arranque y, al mismo tiempo, evita el lavado de lodos debido a la corriente de flujo ascendente. Por otra parte, la granulación y las propiedades fisicoquímicas de los gránulos dependen de elementos como la temperatura, composición del agua residual, iones multivalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}), nutrientes, entre otros
- c) Otros parámetros: diseño del reactor, mezclado, toxicidad de metales presentes en el agua residual, velocidad del flujo ascendente, tiempo de residencia hidráulica y carga orgánica volumétrica

2.6. Acoplamiento de reactores para producción en continuo

En México se han realizado numerosas investigaciones con el objetivo de producir biocombustibles a partir de vinazas tequileras implementando distintas condiciones de operación para obtener la mayor cantidad de biogás:

- En 2009, en un estudio realizado en un biorreactor semicontinuo alimentado a partir de agave tequilero, se determinó el efecto de la temperatura (T), pH y tiempo de retención hidráulica (TRH) sobre la producción de H₂ y CH₄. De acuerdo con los resultados obtenidos, se estableció que el impacto de todos los parámetros es crucial para el comportamiento metabólico microbiano y se encontró que la temperatura óptima para la producción de H₂ fue de 55 °C, mientras que para el CH₄ fue de 35 °C. Además, se sugiere que el pH inicial de la fermentación sea de 5.8 (Espinoza-Escalante et al., 2009)
- En 2009, se obtuvo la máxima producción de hidrógeno (58 mL H₂/Lr-h) en un reactor biológico secuencial (SBR) a una temperatura de 35 °C y un TRH de 6 h utilizando vinazas de la industria tequilera (Buitrón & Carvajal, 2009)
- En 2010, se evaluaron distintas condiciones de temperatura (25 y 35 °C) y de tiempo de residencia hidráulica (12 y 24 h) en un reactor en lote de secuenciación anaeróbica (AnSBR) alimentado a partir de vinazas tequileras. Se reportó que la mayor producción de hidrógeno (50.5 mL H₂/Lr-h) se alcanzó a 35 °C y con un tiempo de residencia hidráulica de 12 h, concluyendo que el TRH es un factor de suma influencia y que, entre más corto sea, habrá una mayor producción de biogás (Buitrón & Carvajal, 2010)
- En 2014, se utilizó un reactor de lecho empacado para la producción de hidrógeno a partir de vinazas tequileras, demostrando que este tipo de sistemas proporcionan una mayor tolerancia a compuestos tóxicos y contra choques de carga orgánica. De acuerdo con los resultados, la productividad más alta fue de 1.73 L H₂/Lr-d con un TRH de 4 h (Buitrón et al., 2014a)

- En 2014, se promovió la producción simultánea de hidrógeno y metano en un reactor de lote secuencial (SBR) y en un reactor UASB, respectivamente, a partir de vinazas tequileras empleando tiempos de residencia hidráulica de 6 y 24 h, en cada caso. Las productividades fueron de 1.38 ± 0.09 L H₂/L-d y de 0.3 ± 0.02 L CH₄/L-d (Buitrón et al., 2014b).
- En 2017, al emplear bagazo de agave como sustrato, se obtuvo la producción más alta de hidrógeno (6 L H₂/L-d) en un CSTR bajo una carga orgánica de 44 g DQO/L-d. El efluente se utilizó para alimentar a un reactor UASB con el fin de favorecer la obtención de metano, alcanzando una productividad máxima de 6.4 L CH₄/L-d al aplicar una concentración de 20 g DQO/L-d con tiempos de residencia hidráulica de 6 y 14 h, respectivamente. (Montiel Corona & Razo-Flores, 2018).

2.7. Uso de soportes (carriers) para la inmovilización microbiana en la producción de hidrógeno

Actualmente, la inmovilización celular es cada vez más utilizada debido a las ventajas que presenta frente a las células suspendidas: mejoramiento del rendimiento de biohidrógeno durante la producción del mismo, resistencia a condiciones de fermentación severas (solventes, pH, metales tóxicos), potencial para incrementar la eficiencia de conversión del sustrato, capacidad de operar a altas tasas de carga orgánica, protección de las células microbianas contra el esfuerzo cortante causado por la agitación, entre otras (Sekoai et al., 2018).

El atrapamiento, la encapsulación, la adsorción y la contención dentro de polímeros sintéticos son algunas de las técnicas de inmovilización más utilizadas. Su elección depende no sólo del tipo de material del soporte, sino también de la evaluación de las características propias de cada una y la forma en la que éstas encajan con las condiciones del bioproceso a ejecutar. De igual manera, es necesario considerar otros parámetros implicados en el proceso que repercuten directamente sobre la producción de biohidrógeno, tales como (Kawan et al., 2016; Sekoai et al., 2018):

- Tamaño, forma y naturaleza del carrier: esta última está relacionada al material, atendiendo que debe poseer un área superficial grande, debe ser hidrofílico, no tóxico para los microorganismos, no biodegradable, económico, con alta retención para la biomasa y permeable
- pH del medio y tiempo de retención hidráulica
- Fuente de carbono
- Tipos de microorganismos utilizados
- Configuración del biorreactor
- Porcentaje de llenado: volumen ocupado por los carriers basado en el volumen de la cama vacía (se recomienda que esté por debajo del 70%)
- Condiciones de mezcla y difusión: la turbulencia dentro del reactor evita que la biopelícula sea demasiado gruesa favoreciendo el transporte del sustrato a través de ésta mediante una difusión adecuada para así mantener el desempeño eficiente del sistema

El crecimiento microbiano dentro del reactor da lugar a la formación de biopelículas en el soporte, lo que propicia que la biomasa adherida se vuelva más especializada al tener una mayor concentración de microorganismos. El uso de biopelículas ha cobrado especial interés en años recientes y, como consecuencia, ha incrementado su inclusión en diferentes procesos, como en el tratamiento de aguas residuales, en donde se han utilizado carriers de polietileno de alta densidad con configuración cilíndrica para la remoción del contenido de fósforo, nitrógeno y de la materia orgánica (Ødegaard, 2006).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, una de las causas más importantes de contaminación en medios acuáticos es el vertimiento de aguas residuales provenientes de diferentes industrias. Esto representa un problema ambiental que afecta a especies animales y flora, así como también a grupos de población que están en contacto con el medio.

En México, particularmente en el estado de Jalisco, la industria tequilera es de las más importantes ya que representa una de las derramas económicas más significativas para el país, en cuanto a manufactura de bebidas alcohólicas se refiere; no obstante, también es una gran fuente de contaminación debido a la gran cantidad de residuos que genera: 1.4 kg bagazo y 10 – 12 L vinazas por litro de tequila producido (López-López et al., 2010).

Lamentablemente, en la actualidad, sólo una pequeña fracción de vinazas es tratada; sin embargo, se han buscado alternativas para su aprovechamiento en la producción de biocombustibles. Gracias a que cuenta con una elevada cantidad de materia orgánica suspendida, es un excelente candidato para emplearse como sustrato para microorganismos anaerobios y, así, propiciar su biotransformación a fuentes de energía alternativa: hidrógeno y metano.

Con el fin de impulsar la producción de biocombustibles a partir de vinazas, es necesario contar con un sistema en el que se garanticen las condiciones aptas para el crecimiento de los microorganismos involucrados en el proceso de fermentación, para ello se hace necesario el uso de un biorreactor en el que se controlen parámetros como pH, temperatura, tiempo de retención hidráulica, concentración del sustrato y relación C/N.

4. JUSTIFICACIÓN

La presente investigación surge debido a la preocupación que existe por la gran descarga de efluentes agroindustriales que se llevan a cabo día a día en nuestro país, tales como las vinazas, provenientes de la industria tequilera. Por este motivo, nace el interés por encontrar una alternativa ecológicamente amigable para su aprovechamiento porque, aunque son muchos los residuos agroindustriales que representan una amenaza para el medio ambiente, para marcar la diferencia, basta con tener la iniciativa y buscar formas de aminorar, en la medida de lo posible, el daño que le estamos provocando.

Atendiendo a esta situación y considerando que las vinazas representan un foco de contaminación relativamente alto debido al impacto que genera su vertimiento inadecuado en el ambiente, conviene aprovechar el potencial que poseen para poder transformarse en biocombustibles mediante la acción de microorganismos anaerobios. Para ello, es necesario determinar las condiciones fisicoquímicas óptimas bajo las cuales se garantizará la mayor producción tanto de hidrógeno como de metano en reactores biológicos, con el propósito de operarlos conectados en serie para obtener ambos biocombustibles de manera simultánea.

5. HIPÓTESIS

Existen condiciones adecuadas de carga orgánica volumétrica aplicadas a un sistema de reactores en continuo, CSTR y UASB, que permiten maximizar la producción de energía utilizando como acarreadores hidrógeno y metano, respectivamente, a partir de vinazas tequileras.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Evaluar la producción de hidrógeno y de metano empleando reactores de distintas configuraciones (CSTR y UASB) en un sistema anaerobio seriado y alimentado en modo continuo a partir de vinazas tequileras bajo distintas concentraciones, con el propósito de estimar su potencial energético.

6.2. Objetivos específicos

- a) Caracterizar las vinazas tequileras empleando los parámetros de carbono orgánico total, demanda química de oxígeno, azúcares totales y reductores, fenoles totales, nitrógeno total y sólidos totales y totales volátiles, con el fin de conocer su potencial como sustrato en procesos anaerobios.
- b) Relacionar el consumo de azúcares totales y azúcares reductores, y la remoción de fenoles totales en el CSTR, con la población microbiana presente en el reactor.
- c) Determinar la eficiencia de remoción de la materia orgánica como DQO en el CSTR y en el UASB.
- d) Identificar el valor de la concentración orgánica volumétrica bajo el cual se obtiene el mayor volumen de biogás y las productividades más altas de hidrógeno y metano, así como la máxima cantidad de energía en cada caso.
- e) Establecer las condiciones bajo las cuales se producen el volumen más alto de biogás y de energía en el sistema

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Muestreo y caracterización de vinazas tequileras

Se utilizó vinaza procedente de una tequilera localizada en Tequila, Jalisco; y se almacenó en bidones de 60 L a una temperatura de 4 °C, hasta su uso. Este residuo es del tipo “sin cocción” debido a que, durante la destilación, se emplean difusores para la obtención de azúcares aplicando directamente agua caliente (80 °C) sobre los tallos de agave crudos previamente triturados (Rodríguez-Félix et al., 2018).

Los contenedores fueron numerados y la vinaza contenida en cada uno fue caracterizada conforme se necesitaba alimentar al sistema de reactores. En la **Tabla 2**, se muestran los parámetros que se evaluaron para el análisis de la composición de la vinaza y el método que se utilizó en cada caso. La información más detallada se encuentra en la sección 12.1. Cabe señalar que, para la determinación de azúcares totales, azúcares reductores y fenoles totales, se realizó una curva de calibración cada vez que se utilizó un nuevo lote (sección 12.2).

Tabla 2. *Parámetros y métodos utilizados para la caracterización de vinaza*

Parámetro	Método
<i>Demanda Química de Oxígeno (DQO)</i>	Standard methods (APHA, 1999)
<i>pH (potencial de Hidrógeno)</i>	Potenciometría
<i>Azúcares Totales</i>	Fenol-sulfúrico (Dubois, 1956)
<i>Azúcares Reductores</i>	DNS (Miller, 1959)
<i>Fenoles Totales</i>	4- aminoantipirina (APHA Standard Methods, 1975)
<i>Nitrógeno Total</i>	Método 10072 HACH
<i>Fósforo Total</i>	Método 10127 HACH
<i>Carbono Orgánico Total (COT)</i>	Equipo analítico Shimadzu
<i>Sólidos Totales (ST)</i>	NMX-AA-034 SCFI-2015
<i>Sólidos Totales Volátiles (STV)</i>	

7.2. Caracterización del inóculo

El consorcio microbiano que se utilizó como inóculo para la producción de biogás provino de un lodo anaerobio granular de un digestor perteneciente a una planta de tratamiento de vinazas de una empresa tequilera localizada en Tequila, Jalisco.

Se realizaron análisis de sólidos totales y de sólidos totales volátiles para poder establecer la cantidad de inóculo a agregar a cada reactor. Previo a ser introducido en el CSTR, el inóculo fue sometido a un proceso térmico (105 °C / 24 h) con la finalidad de seleccionar a las bacterias productoras de hidrógeno a través de su capacidad para producir esporas; por otro lado, sobre el inóculo contenido en el UASB no se efectuó ningún tipo de pre-tratamiento.

7.3. Diseño de reactores

Se diseñaron dos tipos de reactores (CSTR y UASB) basados en los modelos estándares que, generalmente, son utilizados. El CSTR se empleó para la producción de hidrógeno, mientras que en el UASB se llevó a cabo la producción de metano. Ambos reactores fueron construidos en acrílico y cuentan con una chaqueta de calentamiento hidráulica para asegurar el mantenimiento de temperatura en su interior y así evitar posibles fluctuaciones de la misma.

En la **Figura 4**, se pueden apreciar los diseños de ambos reactores. Las medidas están dadas en centímetros, pero son correspondientes con sus respectivas equivalencias en pulgadas. Las dimensiones de las conexiones de la chaqueta hidráulica no se especifican, pero en todos los casos la longitud es de 1" y el diámetro es de $\frac{3}{4}$ ".

Respecto a la tapa del CSTR (**Figura 4a**), las perforaciones para los sensores de pH, temperatura y oxígeno disuelto, fueron diseñadas específicamente para cada uno con la finalidad de que, al ser insertados, encajaran a presión y no quedara ningún espacio disponible para la posible fuga de gas.

Por otro lado, en el interior del reactor UASB (**Figura 4b**), se integraron dos filtros: el manto de lodos se focalizó en el inferior y el segundo fue utilizado como separador de fases, manteniendo los sólidos en las dos primeras zonas del reactor.

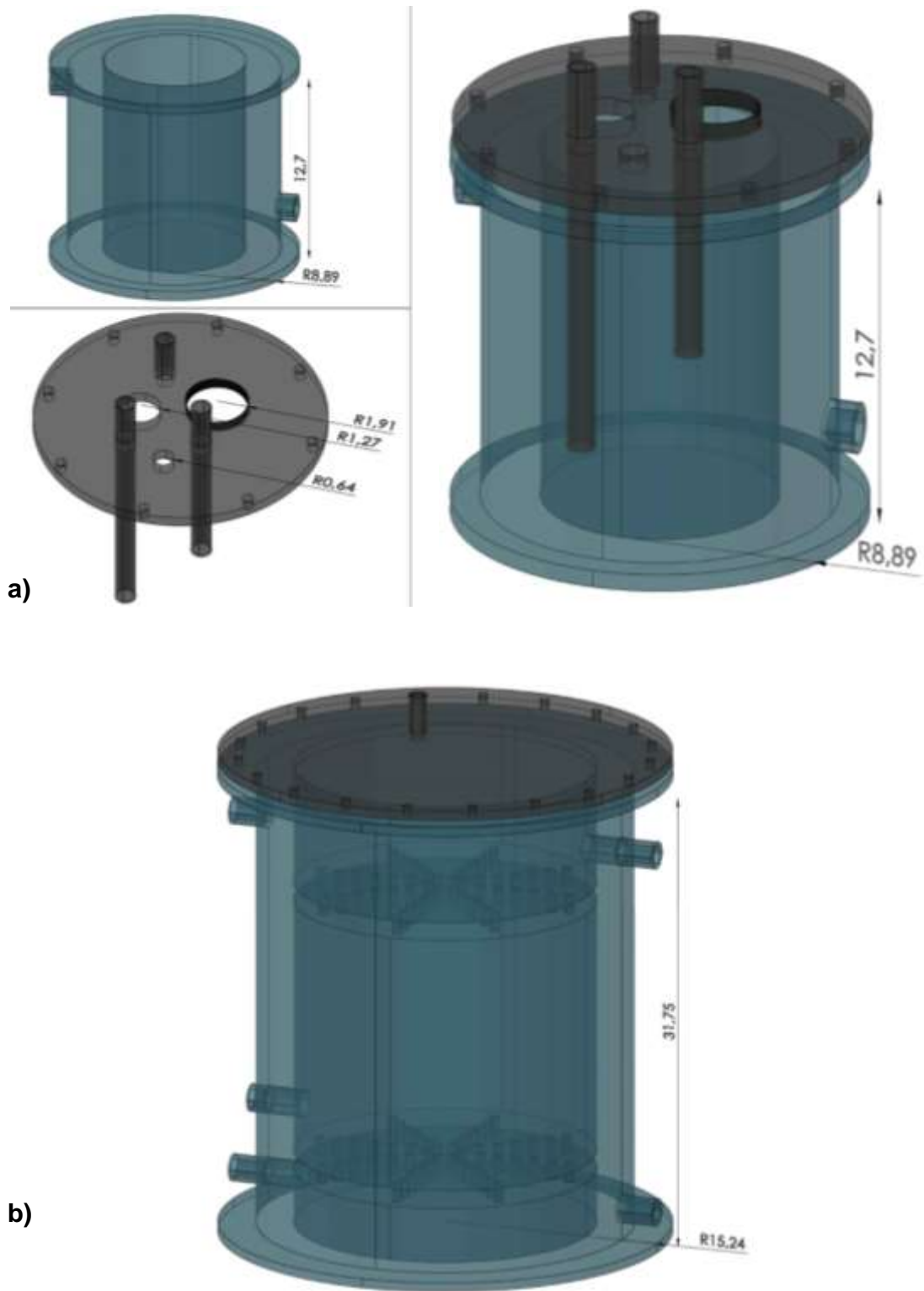


Figura 4. Modelo de **a)** reactor CSTR y **b)** reactor UASB. Medidas (SI): centímetros
Dibujos realizados con ayuda del software AutoCAD.

7.4. Montaje de sistema de reactores en continuo y en serie

7.4.1. Reactor CSTR: producción de biohidrógeno

La capacidad del reactor fue de 1 L con un volumen operacional de 0.74 L. Para la inoculación, se consideró el peso del lodo anaerobio granular respecto a la cantidad de sólidos totales volátiles (STV) y se añadió 4.5 g STV/L (Montiel Corona & Razo-Flores, 2018), concentración utilizada por miembros del Clúster Biocombustibles Gaseosos, cuyo valor se fijó previamente en un trabajo experimental realizado en conjunto con la Red Latinoamericana de Hidrógeno.

El esquema general de la adaptación del CSTR y de los distintos elementos acoplados a éste, se muestra en la **Figura 5**. Más adelante, se describe cada uno con mayor detenimiento.



Figura 5. Fotografía del arreglo del reactor CSTR: **1.** Contenedor de vinaza de alimentación, **2.** Manguera de alimentación, **3.** Manguera para la adición de álcali, **4.** Conexión del espacio de cabeza del reactor hacia el μ Flow®, **5.** Sensores, **6.** Manguera de salida, **7.** Dispositivo cilíndrico para monitoreo del pH del efluente y **8.** Conexión de chaqueta hidráulica

El reactor fue colocado sobre una placa de agitación para asegurar que la barra magnética que se encontraba en su interior mantuviera un movimiento constante generando una mezcla continua en el medio. En los orificios de la superficie de la tapa del reactor, se situaron sensores de pH, oxígeno disuelto y de temperatura (Vernier, EEUU), mismos que se conectaron a una unidad de control y adquisición de datos, la cual estaba conectada a un ordenador con el propósito de monitorear los respectivos parámetros durante todo el experimento. El software utilizado fue Logger Pro (Vernier Software & Technology, EEUU), que permite la visualización de la información resultante de las lecturas de los sensores, tanto de forma escrita como gráfica a través del tiempo.

Para asegurar condiciones anaerobias, el contenido del reactor fue burbujeado con argón durante unos minutos hasta que el nivel de oxígeno disuelto disminuyera, por lo menos, 90% respecto a la cantidad que detectó el sensor inicialmente. La chaqueta de calentamiento hidráulica se mantuvo a 38.0 ± 0.9 °C.

Por otro lado, la vinaza de alimentación fue previamente alcalinizada hasta obtener un pH de 7.0, para ello, se utilizó una solución de hidróxido de sodio (NaOH) a una concentración de 5 M. El líquido era almacenado en un contenedor con capacidad de 10 L, mismo que se mantuvo en un baño con hielo con la finalidad de conservarlo a baja temperatura y así minimizar la fermentación de la vinaza antes de su entrada al primer reactor del sistema.

Para el control de flujo de entrada y salida de vinaza, así como para la medición del volumen de biogás producido en el CSTR, se instalaron tres mangueras en la parte superior de la tapa del reactor. Una de ellas, constituía el enlace entre el espacio de cabeza del reactor y un dispositivo μ Flow® -Bioprocess Control- (medidor de flujo volumétrico de gas que proporciona una medición precisa y fidedigna en tiempo real sobre la mezcla de gases presente en el reactor). Otra de las mangueras fue el conducto de alimentación de la vinaza, misma a la que se le adaptó una llave “T” para que, por ese mismo medio, fuera posible añadir cierto volumen de álcali cada vez que fuera necesario.

La tercera manguera se utilizó para conectar el reactor a un pequeño dispositivo cilíndrico que se utilizó para monitorear el pH del efluente del CSTR, el cual alimentaba al reactor UASB.

Se utilizaron dos bombas peristálticas (1 – 100 RPM Masterflex L/S), una se colocó entre el contenedor de la vinaza de alimentación y el CSTR, y la otra entre el dispositivo cilíndrico y el reactor UASB. Ambas fueron operadas a un flujo constante de 3.7 RPM con el fin de asegurar tiempos de retención hidráulica (TRH) de 4 y de 52 h para el CSTR y el UASB, respectivamente.

7.4.2. Reactor UASB: producción de biometano

El volumen nominal del reactor fue de 10 L, con un volumen de trabajo de 9.4 L. De esta manera, la relación proporcional entre el tamaño del reactor CSTR y del UASB correspondía a 1:10, aproximadamente.

La concentración de lodo anaerobio granular que se inóculo fue de 20 g STV/L, cantidad estándar utilizada para el arranque de este tipo de reactores (Montiel Corona & Razo-Flores, 2018). Previo a iniciar el experimento, el inóculo fue adaptado durante 8 meses utilizando distintas relaciones de vinaza sin cocción y de agua destilada (1:4, 1:3, 1:2, 1).

En este caso, no hubo seguimiento en línea de los parámetros de T, pH y OD; únicamente, en la tapa del reactor, se colocó una manguera que comunicaba el espacio de cabeza del mismo con un dispositivo μ Flow®. La información proporcionada por éste, se utilizó para cuantificar la producción de biogás. La unidad de volumen fijada por el dispositivo μ Flow® viene dada en normal mililitros (NmL), donde N significa “normal”; por tanto, el volumen es calculado en condiciones estándar de presión (1 atm) y de temperatura (0 °C) (Kane & Sternheim, 2007).

Los datos se recabaron diariamente a la misma hora con el fin de tener un registro controlado que proporcionara un reporte fiable sobre el volumen de biogás generado cada 24 h; sin embargo, el monitoreo se realizó de manera ininterrumpida en tiempo real utilizando una cámara de video vinculada a los teléfonos móviles de los miembros del equipo de trabajo.

Con la finalidad de mantener una temperatura constante, las chaquetas de calentamiento de ambos reactores se alimentaron a partir del mismo termobañ.

Adicionalmente, en la salida del efluente se armó una estructura de tubería para impedir la emisión de olores desagradables (**Figura 6**), misma a la que se conectó una manguera que desembocaba en un recipiente, cuyo volumen máximo de almacenamiento era de 20 L, para poder medir diariamente la cantidad de vinaza que salía del sistema de reactores.

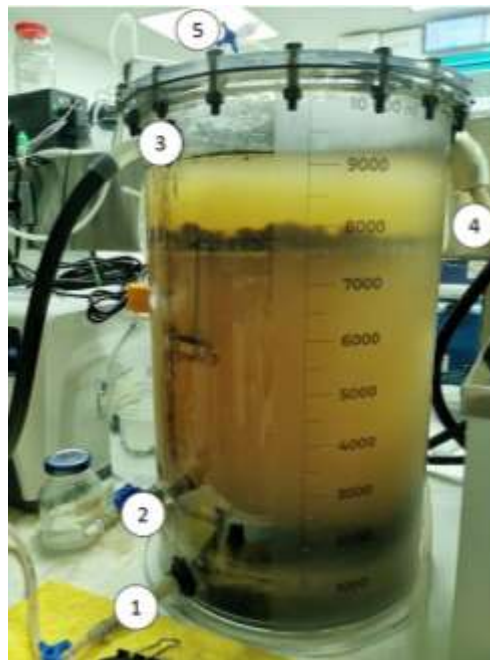


Figura 6. Fotografía del arreglo del reactor UASB: **1.** Manguera de alimentación, **2.** Toma de muestras microbiológicas, **3.** Conexión de chaqueta hidráulica, **4.** Tubería de salida del efluente, **5.** Conexión del espacio de cabeza del reactor hacia el μ Flow®

De acuerdo con los datos de pH en el efluente del reactor CSTR, si éste se encontraba por debajo de 7.0 (óptimo para un reactor UASB), cierta cantidad de álcali era añadida directamente al contenido del reactor por medio de una manguera colocada en la parte lateral superior. Se utilizó una solución de NaOH que, inicialmente, era de 2 M, pero conforme incrementó la concentración orgánica de la vinaza de alimentación, también se aumentó la concentración de la solución de NaOH, llegando a emplear molaridades de 4 y de 5 M.

En la **Figura 6**, se puede observar el acoplamiento de ambos reactores y la distribución de todo el sistema para la producción simultánea de biogás.



Figura 7. *Fotografía del acoplamiento de reactores CSTR y UASB en el laboratorio*

7.5. Arranque de reactores y cambio de concentración orgánica de vinaza de alimentación

Una vez que la vinaza fue caracterizada y se determinó el valor de DQO que poseía, se diluyó con agua destilada hasta alcanzar una concentración de 10 g DQO/L, éste fue el punto de partida para el experimento: el reactor se mantuvo en lote durante 24 h, periodo establecido para el comienzo de producción de biogás (información que se registró en el μ Flow® conectado al CSTR); tras ese lapso, comenzó a ser alimentado de forma continua y fue puesto en serie con el reactor UASB. Se utilizó vinaza con esa concentración orgánica a lo largo de tres semanas con el fin de propiciar una etapa de adaptación para el consorcio microbiano.

Transcurrido ese tiempo, se procedió a cambiar la concentración de la vinaza de alimentación a 15 g DQO/L, misma que se mantuvo durante dos semanas y, posteriormente, se aumentó a 20, 25, 30 y 32 g DQO/L. A partir del segundo cambio, cada una de las etapas tuvo una duración de dos semanas, de manera que el periodo total del experimento fue de poco más de tres meses.

Se utilizaron portadores de biopelícula de polietileno de alta densidad (carriers) Kaldnes K1, con forma cilíndrica y con una cruz en su interior como soportes para la adhesión del inóculo presente en el CSTR. Inicialmente, se vertieron 150 carriers en la vinaza contenida en el reactor para, después, ser sellado y gaseado con argón.

7.6. Toma de muestras del reactor CSTR y del reactor UASB

Diariamente, se tomaron muestras de ambos reactores para análisis posteriores. En el caso del CSTR, la muestra era obtenida desde la manguera de salida que comunicaba la bomba peristáltica con el UASB. Se utilizaron dos tubos de 50 mL (Falcon™, EEUU) que eran almacenados en refrigeración a -4 °C hasta su uso. Los análisis que se hacían con el contenido de cada tubo eran diferentes: uno era utilizado para microbiología y el otro para la determinación de DQO, azúcares totales, azúcares reductores y fenoles totales, parámetros que repercuten en o se ven afectados por el metabolismo microbiano.

Además, cada vez que se realizaba el correspondiente cambio de carga orgánica de la vinaza de alimentación, la tapa del CSTR era abierta con el propósito de facilitar la extracción de carriers, mismos que eran utilizados para análisis genéticos microbiológicos. En cada ocasión, se retiraron 40 carriers de manera aleatoria y se colocaron en un tubo de 50 mL, el cual se conservó en congelación hasta su uso; al mismo tiempo, dichos soportes fueron sustituidos por otros nuevos en el interior del reactor. Una vez realizado el proceso anterior, el reactor era sellado nuevamente y burbujeado con argón con la intención de que la perturbación en el medio no tuviera repercusiones significativas.

Para la toma de muestras procedentes del reactor UASB, se utilizaron dos tubos de 15 y 50 mL (Falcon™, EEUU). En el primero, se vertía una fracción del efluente, se realizaba una medición de pH y el tubo era preservado en refrigeración (-4 °C) ya que, posteriormente, la muestra era analizada para la determinación de DQO. Por otro lado, en el tubo de 50 mL, se almacenaba una pequeña cantidad de lodo anaerobio granular proveniente de la superficie de la cama de lodos asentada en la parte media del reactor, y era preservado en congelación hasta la realización de los análisis genéticos microbiológicos correspondientes.

7.6. Métodos analíticos

7.6.1. Análisis de DQO, azúcares totales, azúcares reductores y fenoles totales presentes en muestras extraídas del efluente del reactor CSTR

La toma de muestra se realizó diariamente; sin embargo, sólo se analizaron las muestras de cada tercer día para la evaluación de DQO y de cada cinco días para la determinación de los otros parámetros considerados (azúcares totales, azúcares reductores y fenoles totales).

De cada tubo de muestra, se tomaba un volumen representativo para realizar las diluciones correspondientes de manera que las concentraciones de las muestras se encontraran dentro del rango de la curva de calibración empleada en cada caso. En la sección 12.1, se describen ampliamente los procedimientos utilizados.

7.6.2. Análisis de DQO en muestras extraídas del efluente del reactor UASB

La toma de muestra se realizaba con la misma periodicidad que en el CSTR y, para la determinación de DQO, también se consideraron los tubos de cada tercer día. La metodología empleada para dicho análisis, se detalla en el **Anexo 1**.

7.6.3. Análisis de composición gaseosa del biogás contenido en muestras extraídas de ambos reactores

A cada manguera que unía el espacio de cabeza de los reactores con sus respectivos dispositivos μ Flow®, se le adaptó una llave “T” y, en ambos casos, se colocaron septos. A través de éstos, con el uso de una jeringa, fue posible realizar el muestreo de biogás que se producía al interior de cada reactor.

La toma de muestra del biogás se realizó diariamente para cada uno de los reactores y se analizó en un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica (Clarus 580, Perkin Elmer, EEUU) y una columna HayeSep D con especificaciones de 3 mm x 3.2 mm y malla 100/120, Perkin Elmer Clarus NOCI. Las temperaturas bajo las cuales se operó el equipo fueron: 40, 75 y 110 °C para el horno, el inyector y el detector, respectivamente; empleando nitrógeno (N₂) como gas acarreador a un flujo de 30 mL/min.

7.7. Cálculo de la producción de energía en cada reactor

Para conocer la cantidad de energía que se generó en cada uno de los reactores, se consideró el volumen de biogás producido por día y se multiplicó por el contenido correspondiente de hidrógeno y de metano, resultados adquiridos del análisis arrojado por el cromatógrafo de gases. El producto de ambos valores se dividió entre 100 debido a que la composición de los gases está expresada en porcentaje. Posteriormente, el resultado se dividió entre el volumen de cada reactor para conocer la cantidad de gas que era liberado diariamente, tanto en el CSTR como en el UASB ($L H_2/Lr-d$, $L CH_4/ Lr-d$). Las expresiones matemáticas utilizadas se representan en las **ecuaciones 1 y 2**.

$$\frac{L H_2}{día} = \frac{(Producción\ de\ biogás/día) (\% H_2)}{100}$$

Ecuación 1. *Cálculo del volumen del biogás generado por día*

$$\frac{L H_2}{Lr - d} = \frac{L H_2/día}{Volumen\ del\ reactor}$$

Ecuación 2. *Cálculo de la producción volumétrica del gas de interés en función del volumen del reactor*

En ambos casos, se reemplazaron los datos correspondientes del hidrógeno por los de metano para calcular la producción volumétrica del mismo en los dos reactores. En la **Ecuación 2**, el volumen del reactor era sustituido por los valores numéricos 0.74 y 9.4 L, ya sea que se tratara del reactor CSTR o del UASB.

Una vez registrados los datos anteriores, se calculó el volumen total de biogás generado en el reactor por día (**Ecuación 3**), con la finalidad de que el resultado obtenido se utilizara para estimar la cantidad de moles de hidrógeno y de metano a partir de la Ley de los Gases Ideales, la cual se presenta en la **Ecuación 4**.

$$\frac{L \text{ biogás}_{total}}{Lr - d} = \frac{\text{Producción de biogás/día}}{\text{Volumen del reactor}}$$

Ecuación 3. Cálculo de la producción volumétrica total del biogás en función del volumen del reactor

$$PV = nRT$$

Donde:

P = presión del gas

V = volumen del gas

n = número de moles

T = temperatura del gas medida en Kelvin

R = constante de los gases ideales

Ecuación 4. Fórmula de la Ley de los Gases Ideales

Los valores de los términos utilizados en la **Ecuación 4**, se calcularon con base en las condiciones normales consideradas para la medición del volumen de gases; es decir, 1 atm (presión) y 25 °C (temperatura), esta última medida se sumó a 273.15, unidades Kelvin equivalentes a grados Celsius. De esta manera, el valor correspondiente de la constante de los gases ideales fue de 0.082058 atm L/mol K.

Al despejar la fórmula representada en la **Ecuación 4**, la evaluación del número de moles de hidrógeno y de metano contenidos en el biogás del reactor CSTR y UASB, respectivamente, se realizó utilizando los datos que se muestran en la **Ecuación 5**.

$$\frac{\text{mol } H_2}{Lr - d} = \frac{\{(\%H_2)(L \text{ biogás}_{total}/Lr - d)\} * P}{R * T}$$

Ecuación 5. Cálculo de la producción volumétrica del número de moles del biogás

Finalmente, la energía (E) emitida por ambos gases de interés se calculó a partir de los resultados obtenidos en la **Ecuación 5**, considerando que el poder calorífico del hidrógeno está establecido en 120 kJ/kg, y el de metano en 50 kJ/kg. La fórmula utilizada está expresada en la **Ecuación 6**.

$$\frac{E}{Lr - d} = (\text{molH}_2/Lr - d) (239.7 \text{ kJ}_{\text{H}_2}/\text{mol}) + (\text{molCH}_4/Lr - d) (801.4 \text{ kJ}_{\text{CH}_4}/\text{mol})$$

Ecuación 6. *Cálculo de la producción de energía*

Asimismo, se evaluó la energía total del sistema generada por día. Como resultado, se obtuvo el producto entre los datos derivados de la **Ecuación 6** con respecto al volumen de cada reactor. Los cálculos se realizaron de acuerdo con la información proporcionada en la **Ecuación 7**.

$$\frac{\text{Energía total}}{\text{día}} = (\text{Energía en CSTR}) (0.74 \text{ L}) + (\text{Energía en UASB}) (9.4 \text{ L})$$

Ecuación 7. *Cálculo de la producción de energía total del sistema*

7.8 Métodos estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del software Statgraphics Centurion XVI.I.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Caracterización de vinaza

El volumen de cada lote de vinaza colectada, se caracterizó utilizando distintas pruebas fisicoquímicas. Los resultados obtenidos se encuentran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Resultados de caracterización de los lotes de vinaza utilizados en este estudio

Etap	I	II	III	IV	V	VI
Parámetro (g/L)	Lote					
	1	2	3	4	5	6
<i>Azúcares totales</i>	5.8 ± 0.05	8.9 ± 0.2	8.8 ± 0.1	11.5 ± 0.1	9.1 ± 0.03	6.3 ± 0.3
<i>Azúcares reductores</i>	10.9 ± 0.3	12.6 ± 1.3	10.6 ± 0.3	15.6 ± 0.4	5.3 ± 0.2	3 ± 0.2
<i>COT</i>	13.76	13.26	15.99	13.41	7.63	10.96
<i>DQO</i>	36.8 ± 0.5	36.1 ± 0.7	33.8 ± 0.2	35.5 ± 1	45.1 ± 0.2	32 ± 0.7
<i>Sólidos Totales</i>	29.9 ± 0.3	24.3 ± 0.3	24.8 ± 0.4	24.8 ± 0.2	15.8 ± 0.2	22.5 ± 0.5
<i>Sólidos Totales Volátiles</i>	28.3 ± 0.2	23.6 ± 0.3	24.1 ± 0.2	23 ± 0.2	14.6 ± 0.1	19.2 ± 0.5
<i>Fosfatos</i>	1.1 ± 0.4	0.9 ± 0.7	1 ± 0.1	1.9 ± 0.01	0.6 ± 0.02	2 ± 0.1
<i>Fenoles totales</i>	0.14 ± 0.025	0.14 ± 0.01	0.1 ± 0.006	0.12 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.005 ± 0.01
<i>N Total</i>	0.1 ± 0.001	0.1 ± 0.02	0.07 ± 0.003	0.1 ± 0.001	0.09 ± 0.002	0.16 ± 0.005
<i>pH</i>	3.33	3.28	3.04	3.55	3.6	3.92

En la parte superior de la **Tabla 3**, se incluyó un apartado en el que se especifican las etapas en las que se dividió el experimento. Cada una está asociada con el lote de vinaza que se utilizó para la alimentación del sistema dentro del periodo de duración correspondiente de cada ciclo.

En algunos casos, un mismo lote de vinaza se empleó durante dos o más etapas: lote 2, etapas I y II; lote 3, etapas II, III y IV

Es posible que la diferencia entre el contenido de los lotes 5 y 6 con respecto a los que se utilizaron anteriormente, se deba a que no todos los lotes se adquirieron al mismo tiempo, sino que la toma de muestra se realizó en dos ocasiones: en la primera, se obtuvieron los lotes 1 – 4 mientras que, los últimos dos, pertenecen a una segunda campaña de muestreo.

La relativa uniformidad en la concentración de materia orgánica de los diferentes lotes de vinaza, favoreció la correcta alimentación de las cargas orgánicas consideradas para cada fase experimental; sin embargo, en el último lote se alcanzó una concentración de 32 ± 0.7 g DQO/L, misma que fue limitante ya que no permitió alimentar al sistema con la carga orgánica más alta planeada. En ese caso, la vinaza se alimentó sin diluir y la carga orgánica resultante, no proporcional al resto de incrementos, se señala oportunamente en la sección del documento en donde se discuten los resultados de la producción de hidrógeno y metano.

Los valores obtenidos sobre los principales parámetros de composición de la vinaza tequilera empleada como materia prima para la producción de biogás, coinciden con los reportados en trabajos anteriores, en donde se ha evaluado que el rango de pH es bastante bajo al oscilar entre 3 y 4, mientras que las concentraciones de DQO y de ST van desde 30 - 80 g/L y 25 – 50 g/L, respectivamente (Buitrón et al., 2014a; López-López et al., 2010; Méndez-Acosta et al., 2010).

Las vinazas tequileras presentan una alta variabilidad en su composición debido a las diferencias entre los procesos de elaboración de la bebida, lo que supone un desafío en la operación de reactores biológicos para la obtención de biocombustibles gaseosos (Arellano-García et al., 2021).

8.2. Producción de biogás en reactor CSTR

Los procesos anaerobios son susceptibles de sufrir ciertas alteraciones que pueden afectar de manera parcial o total el rendimiento del sistema. Los factores que repercuten directamente sobre la estabilidad de la producción de hidrógeno pueden dividirse en bióticos (relacionados con las interacciones microbianas y su metabolismo) y abióticos (parámetros operacionales). La relación entre ambos es sumamente estrecha ya que un cambio repentino en el pH o en la concentración del sustrato, por ejemplo, puede provocar cambios en las comunidades bacterianas (Castelló et al., 2020).

El control y mantenimiento de las condiciones ambientales y operacionales dentro del reactor productor de hidrógeno son claves para el óptimo rendimiento y cruciales para evitar la aparición y posterior actividad de bacterias metanogénicas. Parámetros como el pH, la temperatura, la tasa de carga orgánica, la suplementación de nutrientes, el tiempo de residencia hidráulico, el potencial de óxido-reducción y el tipo de fermentación desempeñan un papel fundamental en la estimulación de la producción de hidrógeno como metabolito y en la inhibición de la metanogénesis (Buitrón & Carvajal, 2010; García-Becerra et al., 2019; García-Depraect et al., 2020; Song et al., 2011).

A pesar de que, en diversas investigaciones, se ha resaltado la influencia de la adición de nutrientes al sustrato, es conveniente hacer hincapié en que en la realización de este experimento no se utilizó ningún tipo de suplemento en la vinaza con el propósito de que el proceso se ejecutara sin la adición de agentes químicos, exceptuando la solución del álcali que se empleó para mantener el medio dentro de un pH adecuado y así evitar la acidificación.

Dicha decisión no sólo está sustentada en la intención de construir un sistema más robusto, sino en la prevención de la disminución de la productividad de hidrógeno a bajas cargas orgánicas, provocada por una alta producción de los ácidos grasos que se forman como consecuencia del incremento en la disponibilidad de los nutrientes adicionales (Carrillo-Reyes et al., 2019).

La temperatura también es un factor elemental ya que se ha demostrado que la operación de un reactor a temperaturas entre 35 y 37 °C aumentan la producción total del biogás y del rendimiento del biohidrógeno, además de favorecer la degradación de la glucosa, la tasa de crecimiento celular y el contenido de ácidos grasos volátiles, precursores en el proceso de metanogénesis (Mu et al., 2006).

El reporte sobre el volumen acumulado de biogás producido en cada etapa experimental, la media de los datos correspondientes a la carga orgánica volumétrica (COV) administrada al reactor CSTR y la concentración de la vinaza de alimentación correspondiente en cada caso, se encuentra en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Registro del volumen acumulado de biogás producido en el reactor CSTR durante cada etapa del experimento de fermentación de vinaza

Etapa	I	II	III	IV	V	VI
DQO (g/L) vinaza	10	15	20	25	30	32
Carga orgánica volumétrica (g DQO/L-d)	56.1	79.6	108.3	128	193	164
Volumen de biogás (NL)	11.7	24.5	26.6	22.8	14.7	5.2

La mayor producción de biogás (26.6 NL, normal litros), se alcanzó cuando el reactor estaba siendo alimentado a una concentración orgánica volumétrica de 108.3 g DQO/L-d. Por otro lado, el volumen más bajo de biogás fue de 5.2 NL, obtenido durante la etapa VI.

A partir de la información proporcionada previamente, es posible advertir que los valores de la carga orgánica volumétrica fueron distintos en cada etapa debido al incremento gradual de la DQO de la vinaza de alimentación; sin embargo, en las últimas dos etapas, el orden ascendente no continuó debido a un problema detectado en la chaqueta hidráulica del reactor metanogénico durante la etapa V (situación que se abordará más adelante), lo que ocasionó el aumento del volumen del efluente a la salida del sistema.

Al respecto, es necesario mencionar que la carga orgánica volumétrica se calculó con base en la medición del volumen del efluente del UASB.

En la **Figura 8**, se muestra gráficamente la producción de biogás a lo largo del tiempo y el volumen (NL), generado por día, se representa en cada punto.

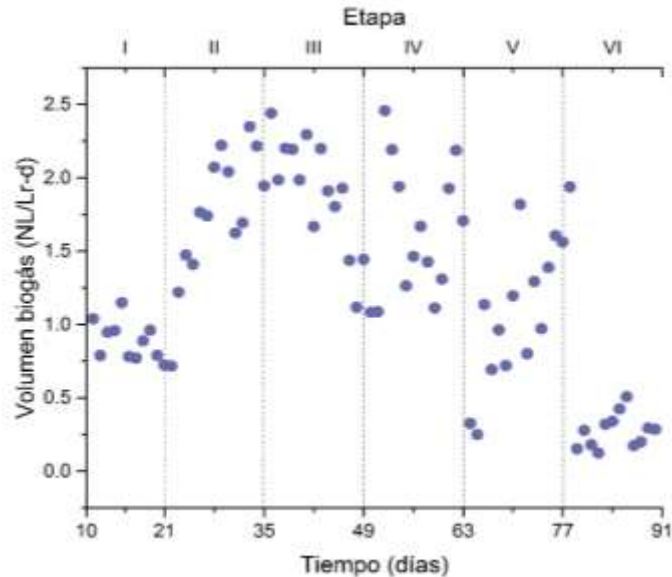


Figura 8. Gráfico de la producción de biogás en el reactor CSTR durante la fermentación de vinaza tequilera a diferentes cargas orgánicas

Con base en los datos de la gráfica anterior, se puede observar que, durante el periodo de adaptación, la producción de biogás se mantuvo relativamente estable y comenzó a incrementar hasta la segunda etapa, en la que se empleó una concentración de sustrato de 15 g DQO/L de vinazas tequileras, correspondiente con una concentración orgánica volumétrica de 79.6 g DQO/L-d.

Precisamente, la etapa II resulta de especial interés debido a que, en comparación con las demás, ésta fue la única en la que se distinguió un aumento constante en la producción de biogás.

Durante las primeras tres etapas del experimento, el comportamiento gráfico de la producción de biogás semeja a una curva: al inicio, la tendencia en el incremento es claramente perceptible.

No obstante, se aprecia una notable disminución a partir de la segunda mitad de la etapa III, incluso durante las etapas IV y V la cuantificación del volumen del biogás presentó numerosas variaciones de un día a otro hasta que, inevitablemente, cayó de manera abrupta (< 0.5 NL) en la etapa VI, cuando la vinaza de alimentación tenía una concentración de 32 g DQO/L.

De acuerdo al análisis ANOVA simple del efecto de la concentración de DQO de la vinaza de alimentación sobre el volumen de biogás producido en cada etapa, se detectó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre un nivel de DQO y otro, como se puede percibir en la **Figura 9**, en donde se identifican tres grupos homogéneos: A, B y C.

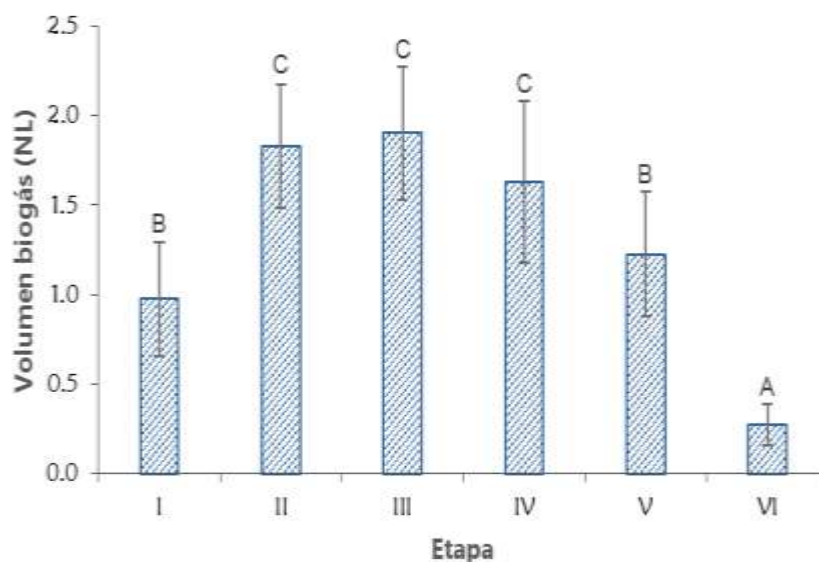


Figura 9. Gráfico de análisis ANOVA simple: efecto de la concentración de DQO de la vinaza de alimentación sobre el volumen de biogás producido en el reactor CSTR. Letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los grupos (LSD $p \leq 0.05$)

Pese a que, en promedio, se obtuvo un mayor volumen de biogás cuando el sistema era alimentado a una concentración de 108.3 g DQO/L-d de vinazas tequileras; es decir, durante la etapa III, en comparación con la II y la IV, las diferencias no fueron significativas entre ellas.

Es importante que la tasa de carga orgánica se encuentre dentro de un rango óptimo para asegurar un desempeño adecuado del reactor y, en consecuencia, favorecer la producción de hidrógeno. En algunos casos, el rendimiento de hidrógeno puede aumentar o, bien, puede disminuir cuando la concentración orgánica es elevada (Hafez et al., 2010). Este último fenómeno se hace especialmente evidente en la etapa VI del experimento realizado en la presente investigación, al emplear una concentración de vinazas tequileras de 32 g DQO/L: a pesar de que la producción de biogás no se detuvo, el volumen obtenido fue inferior en comparación con etapas anteriores, oscilando entre 0.1 y 0.5 L (véase **Figura 8**).

La aplicación de altas concentraciones orgánicas impacta directamente sobre la actividad de los microorganismos productores de hidrógeno provocando que el pH intracelular descienda, además de generar una acumulación de ácidos grasos y una elevada presión parcial de hidrógeno. Este tipo de acontecimientos están asociados a una inhibición por sustrato, riesgo latente que aumenta su incidencia al aplicar cargas orgánicas superiores a 100 g DQO/L-d en sistemas en continuo; no obstante, el uso de soportes para inmovilización celular, tales como biofiltros anaerobios, membranas sumergidas y carriers, como es el caso de este estudio, resulta ser una estrategia factible para controlar tal inhibición. Así, al mismo tiempo, se disminuye el lavado de biomasa manteniendo altas concentraciones celulares en el sistema de fermentación (Buitrón et al., 2019; Elbeshbishy et al., 2017).

La tasa de carga orgánica es un parámetro relacionado con el tiempo de residencia hidráulico, mismo que es preferible manejar a valores bajos durante la producción de hidrógeno ya que, de esta manera, se impide el crecimiento de metanógenos. Al respecto, se ha reportado que, en reactores de membrana, el uso de periodos por debajo de 2 h favorece la producción de ácido acético causando una reducción en la producción de hidrógeno (Buitrón et al., 2019).

La adhesión de los microorganismos a los carriers utilizados en este estudio, permitió que no se produjera un lavado total de biomasa, proporcionando el tiempo de contacto suficiente para que las poblaciones microbianas adquirieran los nutrientes necesarios del sustrato y, de esta forma, pudieran realizar sus actividades metabólicas correspondientes. Incluso con la operación del reactor a valores superiores a 100 g DQO/L-d que, en este caso, fue a partir de la tercera etapa, la producción de biogás no cesó, lo que demuestra no sólo la factibilidad sino también la viabilidad del uso de carriers en la producción de biohidrógeno.

8.2.1. Composición gaseosa en reactor CSTR

En la **Figura 10**, se despliegan los resultados de la composición gaseosa de las muestras extraídas del reactor diariamente. Principalmente, se detectó la presencia de hidrógeno, metano y dióxido de carbono, expresando su abundancia en términos de porcentaje. En general, se puede visualizar que el contenido del hidrógeno en el biogás se mantuvo por encima del 70% durante todo el experimento.

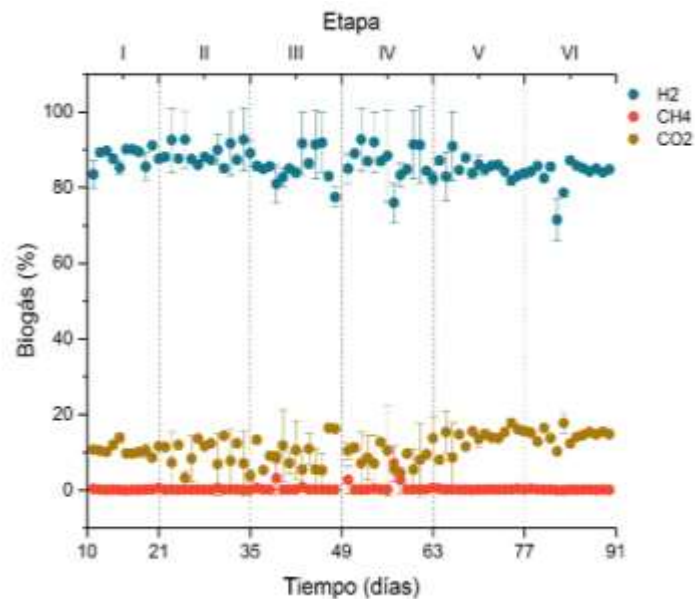


Figura 10. Gráfico de la composición gaseosa de muestras extraídas diariamente del reactor CSTR

La composición porcentual promedio del biogás generado en cada etapa, se representa en la **Figura 11**, en donde, además de distinguirse los gases ya mencionados, se hallaron otros compuestos no identificados cuyos valores, en comparación con la concentración del hidrógeno, son despreciables.

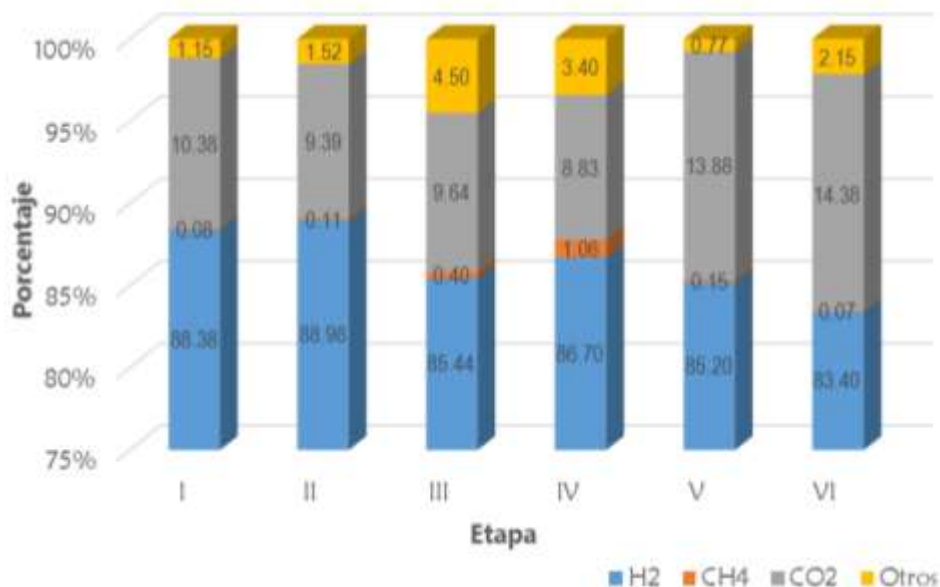


Figura 11. Gráfico de la composición porcentual (por etapa) del biogás generado dentro del reactor CSTR

Con base en la gráfica, es posible advertir que en la etapa II, bajo una carga orgánica volumétrica de 79.6 g DQO/L-d, el contenido de hidrógeno fue superior (88.98%) en comparación con las otras etapas, independientemente de que el volumen total de biogás generado (24.5 NL) no fue el más alto registrado. El mayor se cuantificó en 26.6 NL durante la etapa III; sin embargo, como se mencionó anteriormente, no existió una diferencia significativa respecto al efecto de la concentración de DQO sobre la producción de biogás en ambas etapas, y el porcentaje de hidrógeno en la etapa III no fue tan alta como en la etapa II.

La información obtenida supone que, aunque haya registro de un alto contenido de biogás dentro del reactor, no necesariamente el gas de interés (hidrógeno, en este caso) es el que tiene mayor presencia.

En general, el contenido de hidrógeno en el biogás se mantuvo en un rango entre 71.5 y 92.7%. A este último valor se le atribuye la composición porcentual más alta, misma que se efectuó durante la etapa, cuando la composición promedio del biohidrógeno fue de 86.7%. Asimismo, coincidente con dicho suceso, la abundancia del metano incrementó, alcanzando un valor promedio de 1.1%.

8.2.2. Producción volumétrica de hidrógeno en reactor CSTR

La producción diaria de biogás en el CSTR, así como el contenido de hidrógeno y de metano en el mismo con relación al volumen del reactor, se representa gráficamente en la **Figura 12**. Cada uno se identifica por los colores café, azul y rojo, respectivamente.

Un aspecto a destacar es que los puntos azules (hidrógeno) son muy cercanos a los de color café (biogás), lo cual es indicativo de la buena calidad del biogás, al ser el hidrógeno el más abundante, mientras que la presencia del metano es apenas perceptible.

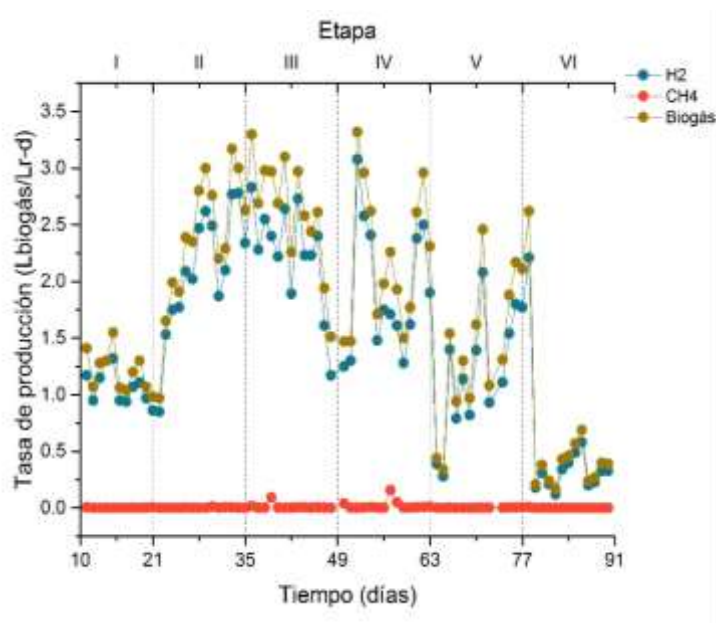


Figura 12. Gráfico de producción volumétrica de biogás en reactor CSTR respecto al tiempo de duración del experimento

De acuerdo con la información proporcionada en el gráfico, la tasa de producción de hidrógeno comenzó en un rango entre 0.9 y 1.3 L H₂/Lr-d. El incremento fue notable de la etapa I a la II, conservando un comportamiento similar hasta la III.

La tendencia en el alza de la tasa de producción de hidrógeno se mantuvo estable mientras el sistema se alimentó a 79.6 g DQO/L-d; es decir, durante la etapa II. A partir de la etapa III, una vez que la carga orgánica volumétrica sobrepasó la cantidad de 100 g DQO/L-d, hubo una apreciable fluctuación entre los resultados, especialmente en las etapas IV y V. Finalmente, la producción disminuyó de manera drástica en la etapa VI, llegando a registrar un valor mínimo de 0.1 L H₂/Lr-d, concerniente al día 82. En contraste, la mayor producción volumétrica de hidrógeno fue de 3.1 L H₂/Lr-d, que se alcanzó durante la etapa IV, bajo una carga orgánica de 128 g DQO/L-d, correspondiente con el pico del día 52.

En promedio, la producción volumétrica de hidrógeno más alta se concentró en la etapa III, obteniendo, en promedio, un volumen y una composición de hidrógeno en el biogás de 2.2 L H₂/Lr-d y de 85.4%, respectivamente. Al otro extremo, el valor más bajo fue de 0.46 L H₂/Lr-d, mismo que se obtuvo en la etapa VI, al aplicar una carga orgánica volumétrica de 164 g DQO/L-d. Concordante con la misma etapa, el contenido de hidrógeno en el biogás fue de 83.4% que, aunque fue el menor durante el experimento, refleja que la calidad media del hidrógeno no decayó a niveles inferiores del 80%.

En otro trabajo, en un reactor en lote de secuenciación anaeróbica en el que se evaluó la producción de hidrógeno a partir de vinazas tequileras, la mayor productividad fue de 50.5 mL H₂/Lr-h, la cual se obtuvo al aplicar una concentración de 3 g DQO/L y un TRH de 12 h. El contenido promedio de hidrógeno en el biogás de 29.2 ± 8.8% (Buitrón & Carvajal, 2010). Posteriormente, en 2014, se alcanzó una tasa de producción volumétrica de hidrógeno mayor en un reactor de lecho empacado con un proceso en modo continuo, obteniendo 1.73 ± 0.2 L H₂/Lr-d y una composición del 64% de hidrógeno, bajo una carga orgánica de 51.6 g DQO/L-d y un tiempo de residencia hidráulica de 4 h (Buitrón et al., 2014a).

Las investigaciones citadas marcaron las bases en la optimización del proceso para el aprovechamiento de uno de los residuos de la industria tequilera.

En 2019, en un reactor CSTR que se operó bajo una concentración orgánica volumétrica de 40 g DQO/L-d de vinazas tequileras suplementadas con una solución de nutrientes y utilizando un TRH de 6 h, la producción volumétrica más alta obtenida fue de 1.3 ± 0.07 L H₂/Lr-d (García-Becerra et al., 2019), casi el 60% de la tasa máxima de producción de hidrógeno reportada en la presente investigación. A su vez, dicho valor también fue superior a 0.15 ± 0.02 L H₂/Lr-d, obtenido al aplicar una carga de 104.6 g DQO/L-d en un estudio en el que, al igual que en éste, se utilizaron carriers en un reactor CSTR alimentado por vinazas tequileras con un TRH de 6 h (Arellano-García et al., 2021).

Cabe mencionar que, en el caso anterior, los carriers no fueron introducidos desde el inicio, lo que provocó que la producción de hidrógeno se detuviera durante algunos días después de haberlos insertado. La causa de dicho comportamiento se atribuye al lavado de biomasa ocasionado por la fricción de los soportes en movimiento con la biomasa ya adherida a otras partes del reactor, trayendo como consecuencia cambios en la población microbiana. Aunque, en días posteriores, la producción de hidrógeno incrementó hasta alcanzar 0.38 y 0.67 L H₂/Lr-d empleando concentraciones de 80 y 120 g DQO/L-d (Arellano-García et al., 2021), los resultados no excedieron el mejor obtenido en el experimento aquí presentado.

Dentro del ensayo ya mencionado, Arellano-García y colaboradores reportaron un aumento del 120% sobre la producción volumétrica de hidrógeno al comparar los resultados con la biomasa en suspensión (0.31 L H₂/Lr-d) y con la subsecuente adición de carriers (0.67 L H₂/Lr-d) empleando una carga de 120 g DQO/L-d en ambos casos. La eficiencia de remoción de DQO y el contenido de hidrógeno en el biogás durante el tiempo de operación del reactor, se mantuvo entre -4.6 y 14.1% y 16.7 y 50.6%, respectivamente (Arellano-García et al., 2021).

Los resultados de este estudio sugieren que utilizar acarreadores de biomasa en un CSTR desde el inicio de la operación, propicia la producción de hidrógeno, incluso a cargas orgánicas por encima de 100 g DQO/L-d. De esta manera, mediante el uso de soportes microbianos, se favorece la preservación de altas concentraciones de biomasa dentro del reactor, factor determinante para mantener la estabilidad de la producción y del rendimiento del hidrógeno (Hafez et al., 2010).

Si bien la obtención promedio de 2.2 L H₂/Lr-d es una cantidad considerable e incluso alentadora, apenas representa casi una quinta parte del valor más alto obtenido en un estudio en el que se alcanzó una producción máxima de hidrógeno de 11.4 ± 0.36 L H₂/Lr-d, empleando un biorreactor de membrana de lodo granular a una concentración de 30 g glucosa/L-d y con un TRH de 4 h (Buitrón et al., 2019). En este caso, la alta productividad podría estar relacionada con el tipo de sustrato utilizado ya que, al ser un agente sintético puro, los microorganismos lo degradan con mayor facilidad en comparación con sustratos complejos o con residuos orgánicos reales, como las vinazas tequileras.

En otra investigación, al combinar la fermentación oscura y la digestión anaerobia a través de la producción secuencial de lactato, hidrógeno y metano, la producción más alta fue de 12.3 L H₂/Lr-d bajo una carga de 169 g DQO/Lr-d a un TRH de 6 h, y con variaciones entre 15.6 y 90.7% respecto a su contenido en el biogás, sin una tendencia clara de la eficiencia de remoción de la materia orgánica que, en promedio, fue del 13.1% (García-Depraect et al., 2020).

Lo anterior pone de manifiesto que inducir una fase de producción de lactato previa a la etapa hidrogénica puede generar un impacto benéfico sobre la producción de hidrógeno debido a la disponibilidad del lactato como su precursor, asegurando así la estabilidad del proceso, en donde, en primera instancia se estimula la predominancia de bacterias ácido lácticas para, posteriormente, dar paso a la proliferación de bacterias productoras de hidrógeno. Del mismo modo, se ha establecido que parámetros como la adición del inóculo, concentración del sustrato, formulación de nutrientes y contenido de sólidos totales, también generan un efecto sobre la producción de biohidrógeno (García-Depraect et al., 2019, 2020).

La representación gráfica respecto al volumen promedio de biogás que se produjo en el reactor en función de la carga orgánica volumétrica contemplada en cada etapa del experimento, se muestra en la **Figura 13**.

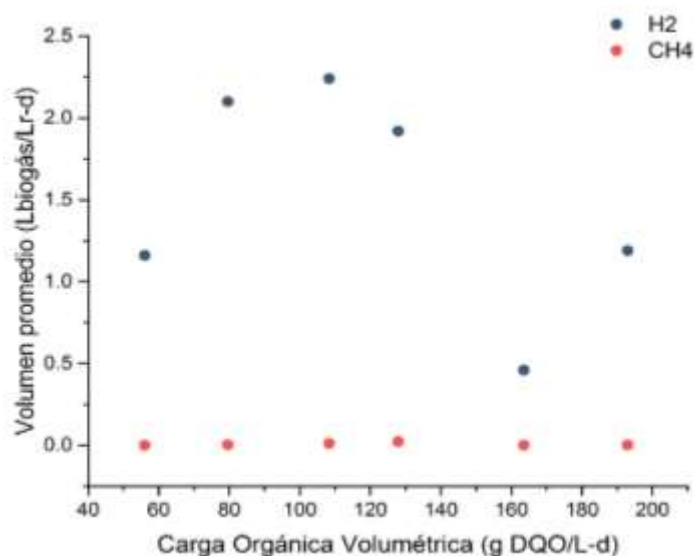


Figura 13. Gráfico del volumen promedio de biogás (H_2 y CH_4) en función de la carga orgánica volumétrica en el reactor CSTR

Como se puede observar en el gráfico, el contenido de metano mantuvo valores por debajo de $0.03 \text{ L CH}_4/\text{L-r-d}$; por tanto, no comprometió la productividad de hidrógeno que, como ya se mencionó, alcanzó el punto máximo en la tercera etapa, pero comenzó a decaer conforme incrementaba la concentración orgánica volumétrica.

8.2.3. Perfil de comunidad bacteriana en CSTR

La eficiencia y estabilidad del hidrógeno depende tanto de la actividad de los microorganismos involucrados como de las interacciones que se generan entre ellos, por ello la ecología microbiana es una de las piedras angulares en este tipo de sistemas (García-Depraect & León-Becerril, 2018).

Acorde con la identificación genética microbiana de la biopelícula formada en los carriers dentro del CSTR empleado en el presente estudio, se encontró que los géneros de mayor abundancia fueron *Sporolactobacillus*, *Prevotella*, *Clostridium* y *Bifidobacterium*, tal como se muestra en la **Figura 14** (Muñoz-Estrada, 2021).

Los resultados obtenidos son coincidentes con los reportados en otros estudios en los que el enfoque principal fue la producción de hidrógeno a partir de vinazas tequileras (Arellano-García et al., 2021) y de hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave (Palomo-Briones et al., 2021).

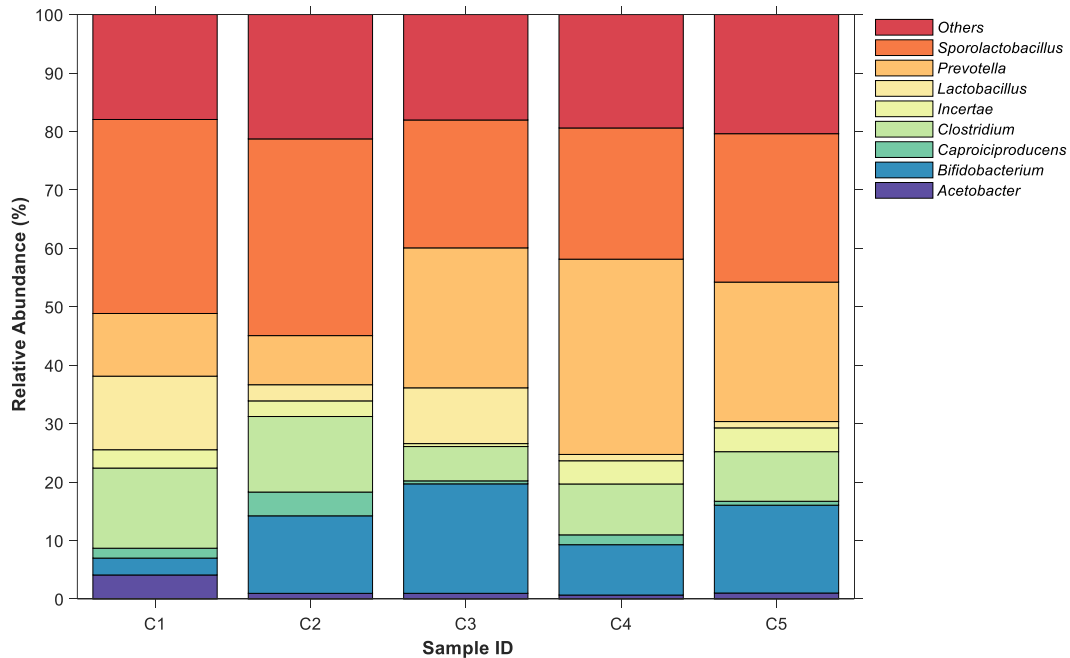


Figura 14. Gráfico de la abundancia relativa de los microorganismos identificados en la biopelícula formada en los carriers dentro del CSTR durante cada etapa experimental. Obtenido de Muñoz-Estrada, 2021

En la gráfica anterior, los microorganismos encontrados se clasificaron de acuerdo a su género. Su abundancia, en cada una de las etapas consideradas dentro del experimento aquí reportado (con excepción de la etapa VI), está expresada en términos de porcentaje.

En las etapas I y II, el género *Sporolactobacillus* fue el que tuvo mayor predominancia, pero conforme la carga orgánica volumétrica incrementó, su presencia en la biopelícula se redujo, dando paso a la proliferación de bacterias pertenecientes al género *Prevotella*, durante las etapas III, IV y V.

Aunque la abundancia relativa de *Clostridium*, principal responsable de la producción de hidrógeno (Elbeshbishy et al., 2017), no dominó sobre la población bacteriana en ninguna de las etapas, tampoco fue totalmente desplazada hasta el punto de no figurar en la biopelícula. Su presencia, de acuerdo con los datos de la **Figura 14**, fue mayor durante las etapas I y II, pero disminuyó a partir de la etapa III, coincidente con la aplicación de cargas orgánicas superiores a 100 g DQO/L-d.

En la etapa III, se registró la menor población de *Clostridium* a lo largo del experimento, lo que podría indicar una posible re-adaptación a mayores concentraciones de sustrato por parte de este tipo de microorganismos ya que, durante las etapas IV y V, hubo un ligero incremento respecto a su abundancia en la biopelícula.

Bifidobacterium fue otro de los géneros con mayor prevalencia durante las etapas II, III, IV y V. Este género pertenece al grupo de bacterias ácido lácticas (BAL) que, a su vez, forman parte de la población acidogénica, la cual constituye alrededor del 90% de la población total de un digestor. En conjunto con *Lactobacillus* spp, estos microorganismos son considerados consumidores de hidrógeno, pero también destacan por su capacidad para metabolizar fructooligosacáridos e inulina, carbohidrato presente en las piñas del *Agave tequilana* Weber var. azul (Ferreira-Rosa & Luiz-Silva, 2016; García et al., 2007; Parra Huertas, 2016).

El rendimiento de la producción de hidrógeno puede verse afectado por el consumo de sustrato por parte de bacterias no productoras de hidrógeno y por el consumo de hidrógeno para generar otros subproductos. En tal sentido, la presencia de metanógenos y de bacterias reductoras de sulfato, homoacetogénicas y ácido lácticas, no es deseable en la fermentación oscura, aunque se mantiene la hipótesis de que estas últimas actúan en alianza con el género *Clostridium* para la producción de hidrógeno a través de la conversión de azúcares y ácidos carboxílicos de cadena corta (Arellano-García et al., 2021; García-Depraect & León-Becerril, 2018).

Se cree que los exopolisacáridos que generan las bacterias ácido lácticas tras la transformación de azúcares a ácido láctico, intervienen en la formación de la biopelícula microbiana. Por su parte, *Clostridium* produce ácido acético e hidrógeno a partir de azúcares y de ácido láctico, respectivamente, dando lugar a la denominada vía lactato-acetato. Entre las especies de *Clostridium* involucradas en dicho proceso, destacan: *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. diolis* y *C. acetobutylicum*. En general, el género *Clostridium* está referido como uno de los principales responsables de la producción de hidrógeno, debido a su capacidad metabólica teórica única de producir hasta 4 mol H₂/mol hexosa consumida (Arellano-García et al., 2021; Palomo-Briones et al., 2021).

Las bacterias ácido lácticas, propias del género *Sporolactobacillus*, son comúnmente detectadas en biorreactores destinados a la producción de hidrógeno, en los que se emplean sustratos lignocelulósicos y vinazas como materia prima para su alimentación (Muñoz-Páez et al., 2020). Su presencia en la biopelícula extraída de los carriers contenidos en el CSTR, puede atribuirse a una interacción positiva con *Clostridium* o, bien, a un fenómeno de inhibición. Éste se origina cuando la tasa de producción de hidrógeno es alta pero la liberación del mismo, desde el caldo de fermentación hacia el espacio de cabeza del reactor, es ineficiente, lo que conduce a una acumulación de hidrógeno disuelto que, a su vez, inhibe la actividad de las bacterias productoras de hidrógeno proporcionando una oportunidad para las ácido lácticas de competir por la absorción del sustrato (Palomo-Briones et al., 2021).

Es posible que la fermentación de carbohidratos y la producción de hidrógeno sean dos acontecimientos que se manifiesten al mismo tiempo, lo que explicaría la coexistencia entre bacterias ácido lácticas y *Clostridium* (Palomo-Briones et al., 2021).

Por otro lado, la existencia de microorganismos pertenecientes al género *Prevotella* ha sido previamente reportada en sistemas anaerobios, empleando sustratos simples y/o complejos para la alimentación de biorreactores productores de hidrógeno; sin embargo, su función en el proceso aún no está completamente definida (Muñoz-Páez et al., 2020).

8.2.4. Producción de energía en reactor CSTR

La tendencia ascendente inicial y la posterior caída de la producción energética en relación con el valor de la carga orgánica volumétrica empleada en cada una de las etapas, se puede distinguir numéricamente en la **Tabla 5**. Los datos reportados corresponden al promedio obtenido por etapa.

Tabla 5. Media de la energía producida en el reactor CSTR en relación con los diferentes valores de carga orgánica volumétrica empleados

Etapa	I	II	III	IV	V	VI
Carga orgánica volumétrica (g DQO/L-d)	56.1	79.6	108.3	128	193	164
Energía (kJ/Lr-d)	0.8	1.5	1.7	1.4	0.1	0.3

De manera gráfica, la **Figura 15** hace referencia a los picos de energía generada diariamente en el reactor CSTR durante el periodo experimental.

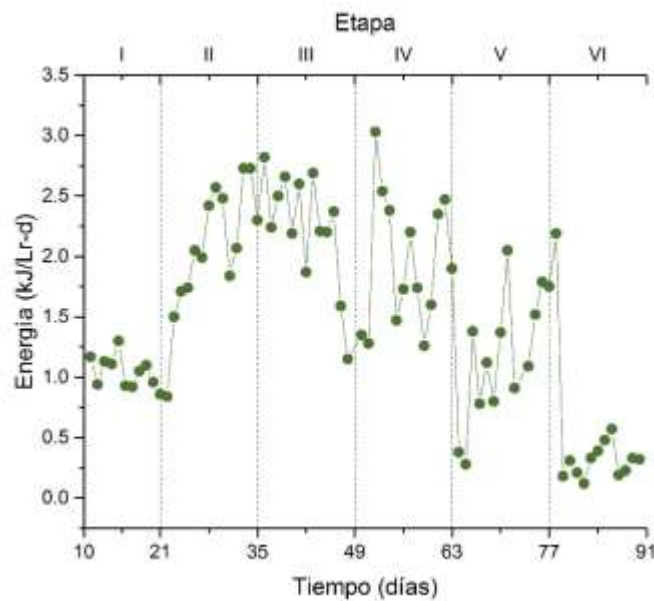


Figura 15. Gráfico de la producción de energía generada en el reactor CSTR

Aunque, en promedio, la mayor cantidad de energía (1.7 kJ/Lr-d) se concentró en la etapa III tras aplicar una carga orgánica volumétrica de 108.3 g DQO/L-d, el pico más alto se registró en la etapa IV, alcanzando 3.03 kJ/Lr-d el día 52, mismo día en el que se obtuvo la máxima producción volumétrica de hidrógeno (3.1 L H₂/Lr-d). Finalmente, el nivel de energía disminuyó de manera considerable en la última etapa y el pico más bajo corresponde al día 82, teniendo un valor de 0.12 kJ/Lr-d.

8.2.5. Contenido de azúcares totales y azúcares reductores presentes en vinaza y en muestras extraídas del reactor CSTR

Las piñas del *Agave tequilana* Weber var. azul, en relación a su peso en seco, contienen alrededor del 75% de carbohidratos, que comprenden glucosa, dextrinas, almidón e inulina, en mayor cantidad, la cual representa un total del 20 – 24%. Este último pertenece al grupo de los fructanos, polímeros formados por moléculas de fructosa dispuestas en cadena lineal y unidas entre sí por medio de enlaces glucosídicos β (2,1) y β (2,6) en cuyo extremo reductor puede encontrarse un residuo de glucosa. Los fructanos constituyen los principales carbohidratos de reserva que se encuentran en algunas familias del reino vegetal (García et al., 2007; Martínez Reséndiz et al., 2016; Montañez et al., 2011).

Durante el cocimiento del agave en el proceso de elaboración del tequila, la inulina presente en las piñas se degrada para dar lugar a la obtención de moléculas de fructosa, sacarosa y glucosa, azúcares reductores utilizados para la obtención de alcohol a través de un proceso de fermentación. Aunque también es posible encontrar azúcares reductores en las hojas de la planta, el mayor contenido se localiza en la piña, motivo por el cual es utilizada como materia prima fuente de azúcares fermentables (Bautista et al., 2001a; Montañez et al., 2011).

8.2.5.1. Azúcares totales

En la **Tabla 6**, se presentan los datos teóricos respecto a la concentración de azúcares totales a la entrada del sistema, dependiendo el lote y la carga orgánica (DQO) requerida de la vinaza de alimentación.

Tabla 6. Concentración teórica de azúcares totales a la entrada del sistema de reactores durante cada etapa experimental

Etapa	DQO (g/L) vinaza	Carga orgánica volumétrica (g DQO/L-d)	Lote vinaza de alimentación	Azúcares totales (g/L)
I	10	56.05	1	1.6
			2	2.5
I	15	79.6		3.7
				3.9
III	20	108.34	3	5.1
IV	25	127.92	4	8.1
V	30	192.97	5	6.1
VI	32	163.53	6	6.3

Con base en la información de la tabla anterior y en el análisis referente a la cuantificación de azúcares totales en las muestras extraídas del CSTR, se obtuvieron los resultados que se muestran en la **Figura 16**. Los puntos azules hacen referencia al contenido presente en la vinaza de alimentación, mientras que los de color café corresponden al de las muestras.

La primera etapa, cuya duración fue de 21 días, se consideró como un “periodo de adaptación” para el consorcio microbiano, tiempo en el que el sistema de reactores fue abastecido bajo una concentración de 10 g DQO/L de vinazas tequileras y una carga orgánica volumétrica de 56.05 g DQO/L-d.

Aproximadamente, se analizaron entre tres y cuatro muestras del efluente del CSTR en cada etapa, El mayor consumo de azúcares totales ocurrió en la etapa IV, representando un total de 25%. En contraste, durante la etapa III, la concentración de azúcares totales fue superior en las muestras en comparación con el valor teórico calculado sobre la vinaza de alimentación ya diluida.

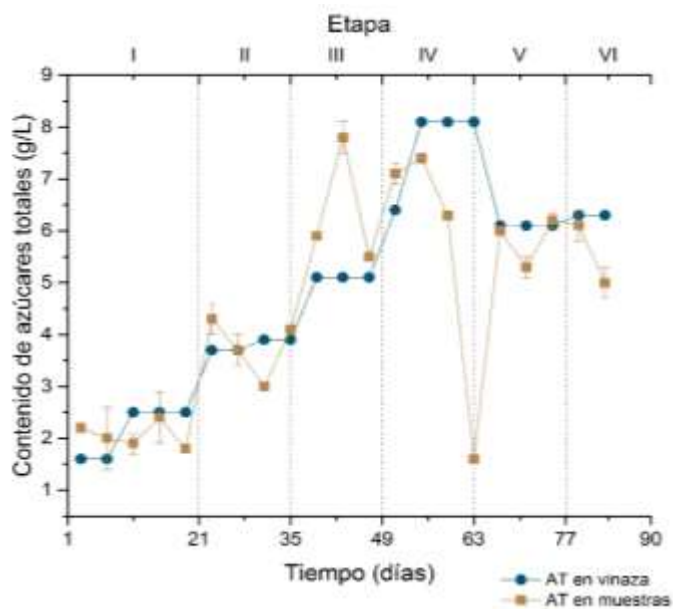


Figura 16. Gráfico de la relación entre el contenido de azúcares totales presentes en vinaza y en las muestras extraídas del reactor CSTR

Es posible que la concentración teórica de azúcares totales haya diferido con la que realmente estaba entrando al sistema en relación al lote de vinaza y a la carga orgánica correspondiente o, bien, que los microorganismos involucrados en el proceso de fermentación, de acuerdo con la vía metabólica que desarrollaron, estuvieran consumiendo otras moléculas distintas a los azúcares, lo que explicaría su bajo aprovechamiento durante el periodo experimental.

Tal como se mencionó en la sección 8.2.3, la presencia de bacterias consumidoras de hidrógeno, que predominó sobre la población de *Clostridium*, sostiene la posibilidad de que el consumo de sustrato no estuvo dirigido únicamente hacia el aprovechamiento de azúcares totales, sino que también se utilizó hidrógeno como precursor para la formación de otros subproductos.

La realización de un análisis por cromatografía de líquidos podría constatar o descartar, según fuera el caso, la hipótesis anteriormente planteada; sin embargo, los alcances de la presente investigación fueron limitados.

8.2.5.2. Azúcares reductores

La concentración del sustrato es un factor importante en la producción de biohidrógeno, sobre todo cuando el inóculo utilizado se trata de un consorcio, ya que se puede favorecer el desarrollo de microorganismos no deseados que conduzcan a la disminución de la producción del hidrógeno, como es el caso de las bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* que, a bajas concentraciones de glucosa, pueden superar la actividad de *Clostridium*, ya que dirigen el sistema hacia la formación de ácido láctico, convirtiéndolo en el metabolito principal y disminuyendo la producción de biogás (Díaz-Cruces et al., 2020; Park et al., 2018).

La información respecto a la evaluación teórica sobre la concentración de azúcares reductores presentes en cada lote, en correspondencia con la carga orgánica inducida de la vinaza de alimentación, se encuentra en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Concentración teórica de azúcares reductores a la entrada del sistema de reactores durante cada etapa experimental

Etapa	DQO (g/L) vinaza	Carga orgánica volumétrica (g DQO/L-d)	Lote vinaza de alimentación	Azúcares reductores (g/L)
I	10	56.05	1	3.0
			2	3.5
I	15	79.6	3	5.2
				4
III	20	108.34	3	6.3
IV	25	127.92		7.8
V	30	192.97	4	11.0
V	30	192.97	5	3.5
VI	32	163.53	6	3

La relación entre la cantidad de azúcares reductores a la entrada del sistema y la concentración detectada en las muestras analizadas, se representa gráficamente en la **Figura 17**.

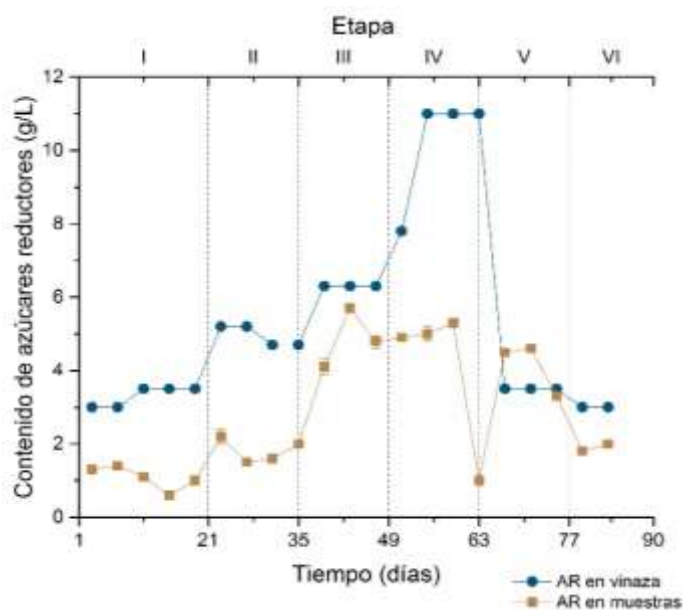


Figura 17. Gráfico de la relación entre el contenido de azúcares reductores presentes en vinaza y en las muestras extraídas del reactor CSTR

De acuerdo con la gráfica anterior, el mayor consumo de azúcares reductores (66.6%) se concentró al inicio del experimento; es decir, durante la etapa I. Asimismo, en las etapas II y IV, es posible visualizar un comportamiento de consumo similar (63.1 y 58.6%, respectivamente); sin embargo, en comparación con las etapas previamente mencionadas, el aprovechamiento de azúcares reductores fue menor durante las etapas III (22.8%) y VI (36.7%).

Por su parte, la etapa V resalta por haber sido la única en donde no se registró disminución del contenido de entrada de azúcares reductores, sino que, en realidad, los resultados del análisis arrojaron una concentración superior en las muestras. Lo anterior podría estar relacionado con el incremento de especies del género *Bifidobacterium* durante dicha etapa con respecto a su abundancia relativa en la etapa IV (véase **Figura 14**) que, como se mencionó en la sección 8.2.3, son reconocidas por ser bacterias consumidoras de hidrógeno.

Los resultados sobre la composición gaseosa del biogás producido en el CSTR (**Figura 11**), sustentan la hipótesis sobre el consumo de hidrógeno ya que, precisamente, en las últimas dos etapas, el contenido de hidrógeno fue el más bajo detectado a lo largo del experimento: 85.2 y 83.4%, respectivamente.

En la **Figura 18**, se muestra el contraste respecto a la cantidad de azúcares totales (simbología azul) y reductores (verde) presente en las muestras analizadas. En general, el comportamiento fue similar, salvo en las etapas V y VI, hecho que podría asociarse con la concentración inicial de dichas macromoléculas en la vinaza de alimentación: 6.1 y 6.3 g/L en el caso de azúcares totales y 3.5 y 3 g/L en azúcares reductores (véase **Tabla 6 y 7**), prácticamente la mitad de la disponibilidad que en los primeros.

Ante el hecho previamente descrito, es necesario hacer hincapié en que, en los lotes de vinaza utilizados para alimentar el sistema de reactores durante etapas anteriores, la concentración de azúcares reductores fue mayor que la de azúcares totales. Además, en la etapa V, el consumo de azúcares totales fue bajo (4.4%), mientras que la concentración de azúcares reductores fue más alta en las muestras que en la vinaza de alimentación (véase **Figura 16 y 17**).

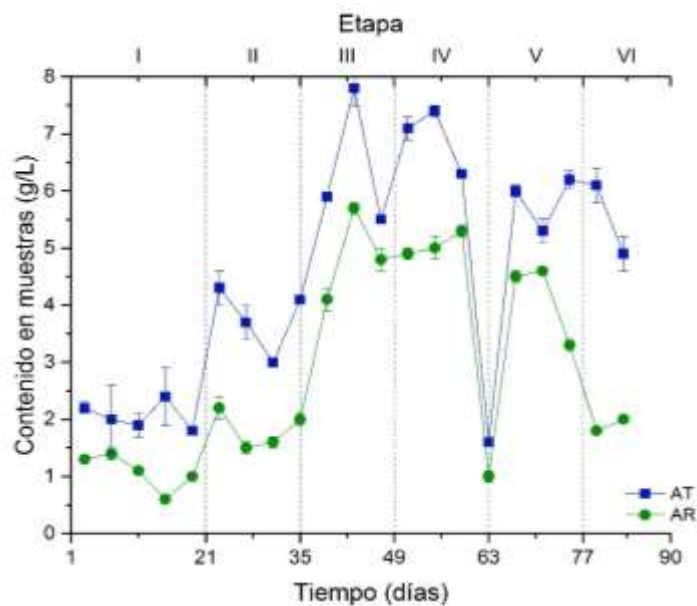


Figura 18. Gráfico de los resultados de la concentración de azúcares totales y azúcares reductores presentes en muestras extraídas del reactor CSTR

8.3. Producción de biogás en reactor UASB

En general, el reactor UASB es ampliamente utilizado para el tratamiento de corrientes con una alta concentración de materia orgánica, como es el caso de las vinazas, debido a que presenta algunas ventajas como la baja producción de lodo y la conversión a biogás de, aproximadamente, el 50% de la DQO total de la vinaza (Gomes de Barros et al., 2016).

De acuerdo con los datos recabados por el dispositivo μ Flow®, el volumen de biogás que se produjo en el reactor UASB fue mayor que en el del CSTR debido, en principio, a la diferencia existente respecto a la relación del tamaño entre ambos.

En la **Tabla 8**, se presentan los datos sobre la cuantificación del volumen total de biogás generado en el reactor UASB y del promedio de la carga orgánica volumétrica con relación a la concentración de la vinaza de alimentación (DQO) en cada una de las etapas consideradas dentro del experimento.

Tabla 8. Registro del volumen acumulado de biogás producido en el reactor UASB durante cada etapa del experimento de fermentación de vinaza

Etapas	I	II	III	IV	V	VI
Carga orgánica volumétrica (g DQO/L-d)	4.4	6.3	8.5	10.1	15.2	12.9
Volumen de biogás (NL)	24.5	33.8	36.7	9.5	19.9	32.1

En concordancia con los resultados sobre el volumen de biogás obtenido en el CSTR (véase **Tabla 4**), la mayor producción de biogás en el UASB también se obtuvo durante la etapa III, bajo una carga orgánica de 8.5 g DQO/L-d, alcanzando 36.7 NL. En cambio, el menor volumen de biogás se registró en la etapa IV, correspondiente con un total de 9.5 NL.

Respecto a los valores de la carga orgánica volumétrica, es necesario subrayar que, durante la etapa V, se originó una fuga en la chaqueta hidráulica del reactor, lo que provocó un incremento en el volumen final del efluente y, en consecuencia, se obtuvo una mayor carga orgánica (15.2 g DQO/L-d) en dicha etapa en comparación con la etapa VI (12.9 g DQO/L-d).

En la **Figura 19**, se representa el volumen de biogás generado por día en el UASB. La imagen general nos aporta un comportamiento errático sobre la producción de biogás en el reactor, advirtiendo un ligero incremento durante las primeras tres etapas, similar al observado en el CSTR (**Figura 8**); sin embargo, en la segunda mitad de la etapa III, se registró una caída respecto al volumen de biogás generado en días previos.

Posteriormente, en las etapas IV y V, se presentó una alta variación entre los datos obtenidos debido a que, durante algunos días, la producción de biogás fue nula, pero logró recuperarse una vez más en la etapa VI, manteniéndose en un rango entre 1.9 y 4.4 NL.

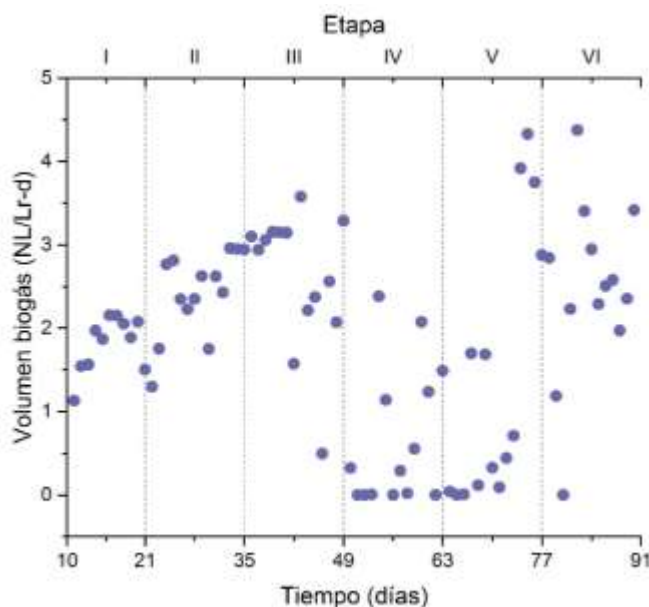


Figura 19. Gráfico de la producción de biogás en el reactor UASB durante la fermentación de vinaza tequilera a diferentes cargas orgánicas

Durante la etapa V, al aplicar una concentración de 15.2 g DQO/L-d, se encontró una fuga en la chaqueta hidráulica al interior del UASB, lo que derivó en su desmontaje total. Tras repararla, se reanudó la operación del reactor y la biomasa recuperada se mezcló y se introdujo nuevamente.

En días subsecuentes a la resolución de la avería, se pudo observar el incremento en la producción de biogás, es por ello que a partir del día 74 (**Figura 19**) se registró un volumen mayor en comparación al obtenido en días anteriores.

Como parte del análisis estadístico ANOVA simple, se encontró que existe una diferencia significativa en relación al nivel de concentración de DQO de la vinaza de alimentación respecto al volumen de biogás que se generó en cada etapa, de tal modo que es posible distinguir dos grupos homogéneos: A y B (**Figura 20**).

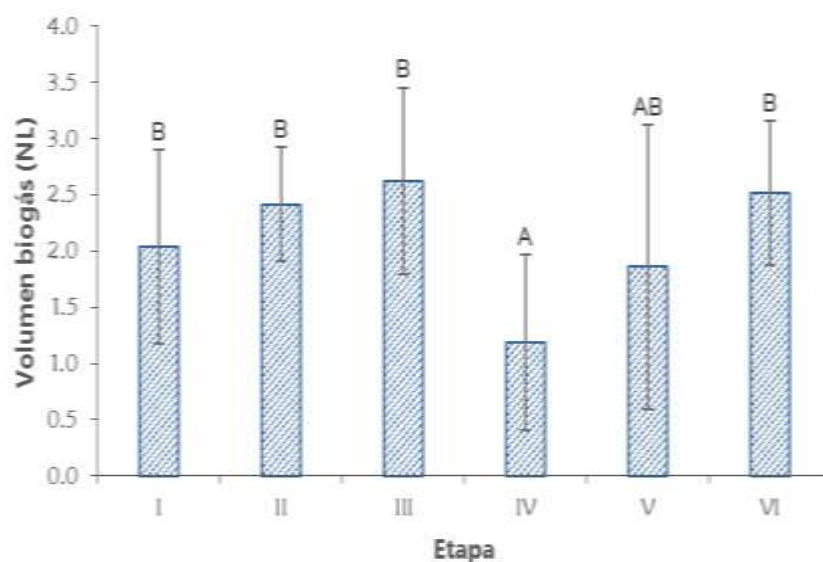


Figura 20. Gráfico de análisis ANOVA simple: efecto de la concentración de DQO de la vinaza de alimentación sobre el volumen de biogás producido en el reactor UASB. Letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los grupos ($LSD p \leq 0.05$)

El resultado del bajo volumen de biogás (9.5 NL) obtenido en la etapa IV, fue consecuencia de la tardía identificación de una fuga del mismo en la estructura de la tubería localizada a la salida del efluente; no obstante, una vez resuelto el inconveniente, aumentó el registro de la producción de biogás en el μ Flow®.

Desafortunadamente, la pérdida del biogás generado dentro del reactor ocurrió durante el tiempo suficiente para que la producción total alcanzara números tan bajos durante la etapa IV.

Las dificultades a las que se hicieron frente en las etapas IV y V son, precisamente, las razones por las que la desviación estándar es tan alta en las barras correspondientes a dichas etapas, como se observa en la **Figura 20**.

Las vinazas son un residuo que se genera en abundantes cantidades y que cuenta con altas concentraciones de DQO; por tanto, los digestores utilizados para su tratamiento deben tener la capacidad de operar a elevadas tasas de carga orgánica (Arreola-Vargas et al., 2018).

En general, se ha establecido la existencia de una tendencia directamente proporcional entre el aumento de la producción de biogás y el de la carga orgánica volumétrica (Méndez-Acosta et al., 2010); sin embargo, en la presente investigación no se percibió dicha asociación pese a que, en este caso, la concentración más alta evaluada fue de 15.2 g DQO/L-d (**Tabla 8**). Entre otras razones, los contratiempos técnicos que se presentaron en las últimas etapas del experimento pudieron haber influido.

8.3.1. Composición gaseosa en reactor UASB

En la **Figura 21**, se muestran los principales gases contenidos dentro del reactor: hidrógeno, metano y dióxido de carbono. Su abundancia está expresada en términos de porcentaje y, gráficamente, se distingue por los colores azul, rojo y café, correspondientes con cada uno de los gases.

Al inicio del experimento, la cantidad de hidrógeno en el reactor se encontraba mínimamente por encima de la de metano, pero con el paso de los días ésta logró elevarse y predominar dentro del reactor posicionándose como el gas de mayor abundancia. A pesar de que este comportamiento se mantuvo durante algunas semanas, los números decayeron a partir del día 39 (etapa III) trayendo como consecuencia el aumento de hidrógeno en el sistema.

La presencia del dióxido de carbono, en cambio, manifestó una gran variación en las etapas I y II, y se mantuvo en un rango entre 11.2 y 22.1% durante la etapa III. Aunque durante los primeros días de la etapa IV, se observó un ligero incremento respecto a su contenido en el biogás, éste volvió a disminuir al final de la etapa, hasta llegar a 9.5%. Por último, a partir del día 74, posterior a la reparación de la fuga de la chaqueta hidráulica, el porcentaje de dióxido de carbono aumentó nuevamente, alcanzando un contenido máximo de 34.4% en el biogás.

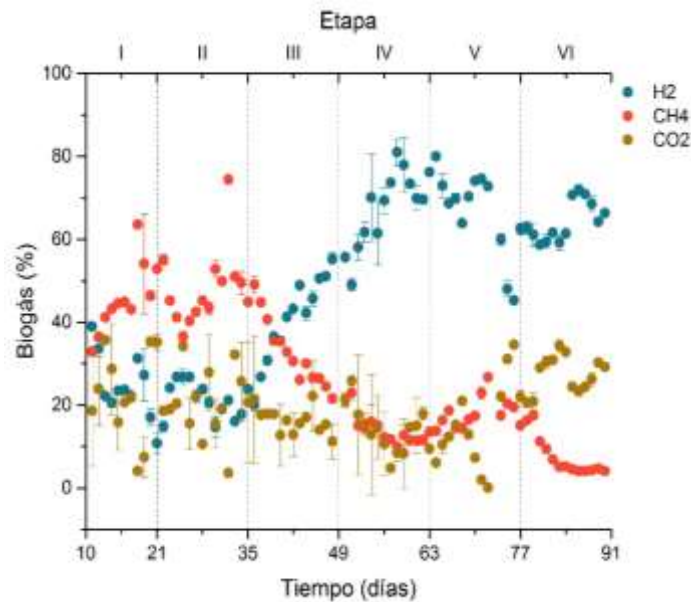


Figura 21. Gráfico de la composición gaseosa de muestras extraídas diariamente del reactor UASB

La composición porcentual promedio del biogás contenido dentro del reactor, se presenta en la **Figura 22**. A partir de ésta, es posible observar que la mayor producción de metano se obtuvo en la etapa II, correspondiente con un total de 47.98%.

Por otro lado, en la etapa VI, se registró el valor mínimo sobre la abundancia de metano en el biogás a lo largo del experimento, el cual fue de 7.5%, casi siete veces menor que el observado en la etapa II.

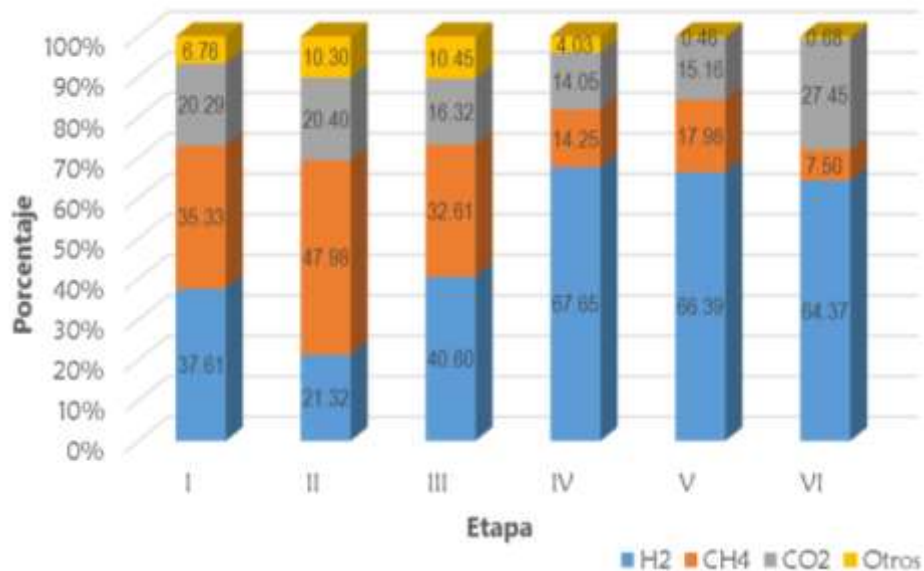


Figura 22. Gráfico de la composición porcentual (por etapa) del biogás generado dentro del reactor UASB

En realidad, la disminución de metano y el subsecuente incremento de hidrógeno comenzó desde la etapa III; es decir, tras haber alimentado el reactor a una carga orgánica superior a 8.5 g DQO/L-d, lo que supone una modificación en la población microbiana. Al respecto, es necesario hacer mención de la posibilidad del aumento de bacterias productoras de hidrógeno como consecuencia del lavado de biomasa del CSTR ya que, incluso, se advirtió un cambio de coloración en los gránulos de lodo anaerobio contenidos en el UASB (**Figura 23**).

El cambio de tonalidad se manifestó de un color negro a uno marrón claro, lo cual está asociado con la supresión de la actividad sulfidogénica (sulfato-reductora) de los microorganismos comprendidos en los gránulos. Generalmente, este fenómeno se ha observado en la adaptación de lodo anaerobio granular con actividad metanogénica para dar paso al desarrollo de microorganismos productores de hidrógeno (Buitrón et al., 2019). Con base en ello y de acuerdo a la composición gaseosa del biogás en el UASB (**Figura 22**), es posible afirmar que durante las etapas III, IV, V y VI el reactor se comportó como productor de hidrógeno, alterando la disposición inicial del sistema, en donde se determinó que el CSTR se utilizaría para la producción de hidrógeno y el UASB para la de metano.



Figura 23. *Fotografías del lodo anaerobio granular, correspondientes con las etapas experimentales V y VI*

Respecto al análisis realizado en el cromatógrafo de gases, se encontró que los valores más altos de metano se obtuvieron durante las etapas I y II, con porcentajes entre 30.2 y 74.4%, siendo este último el mayor registrado a lo largo del experimento, correspondiente con los últimos días de la etapa II. En semanas posteriores, el contenido de metano en el biogás fue decayendo y, a partir del día 80, su proporción en el reactor comenzó a ser poco representativa ya que ni siquiera alcanzaba el 10% en la composición total del biogás. Finalmente, en la etapa VI, el porcentaje de metano descendió hasta 4.11%.

Por otra parte, es importante señalar la similitud del comportamiento del UASB con respecto al CSTR ya que, en ambos, destacaron las etapas II y III. En el primer caso, se registró la cuantificación más alta del gas de interés mientras que, en la etapa III, se obtuvo la mayor producción de biogás.

8.3.2. Producción volumétrica de metano en reactor UASB

En la **Figura 24**, se muestran los resultados obtenidos sobre la producción volumétrica del biogás y del contenido específico de hidrógeno y metano dentro del reactor UASB a través del tiempo.

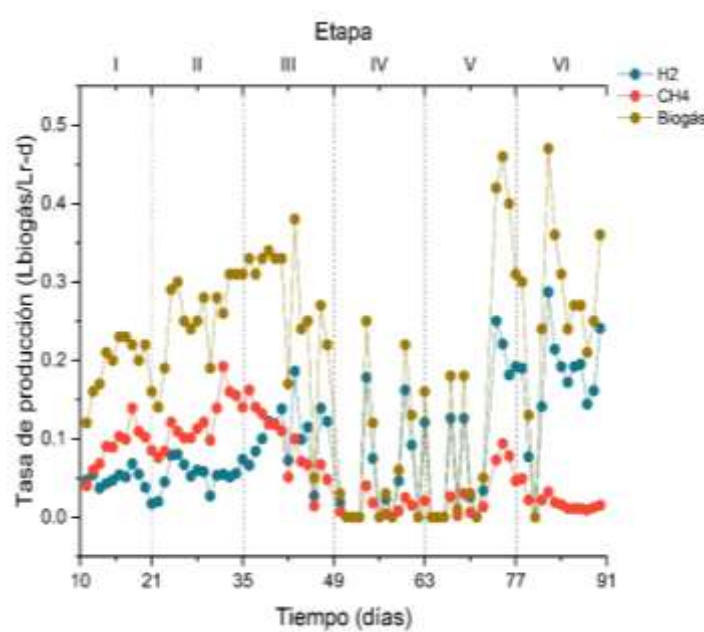


Figura 24. Gráfico de la producción volumétrica de biogás en el reactor UASB respecto al tiempo de duración del experimento

Según los datos de la gráfica, es posible visualizar que el comportamiento del hidrógeno en relación con el de metano es inversamente proporcional durante los primeros 38 días del experimento; sin embargo, a partir de la segunda mitad de la etapa III, la productividad del hidrógeno superó a la de metano ocasionando que éste sufriera una caída en la tasa de producción, disminuyendo de 0.140 hasta 0.002 L CH₄/Lr-d en la etapa V. A su vez, este hecho está relacionado con el descenso de la producción de biogás en el reactor durante ese periodo de tiempo, consecuencia de los problemas técnicos mencionados en la sección 8.3.

Posterior a la reparación de la fuga de la chaqueta hidráulica del UASB, se registró un breve aumento en la productividad de metano durante los días 74 a 78. Desde ese punto hasta el final del experimento, la tasa de producción se mantuvo entre 0.011 y 0.022 L CH₄/Lr-d.

El valor más alto respecto a la producción volumétrica de metano, se alcanzó en la etapa II, correspondiente con una carga orgánica de 6.27 g DQO/L-d, obteniendo 0.192 L CH₄/Lr-d. El dato más bajo obtenido, en cambio, fue de 0.002 L CH₄/Lr-d, cuyo registro se realizó en la etapa V, concordando con la carga orgánica volumétrica más alta evaluada: 15.2 g DQO/L-d.

La etapa II también destacó por haber sido aquella en la se concentró la mayor productividad de metano que, en promedio, fue de 0.12 L CH₄/Lr-d, correspondiente con un contenido del mismo en el biogás de 47.98% (**Figura 22**). Por el contrario, como ya se mencionó, en las etapas IV, V y VI, la disminución de la producción volumétrica se vio reflejada en los bajos valores promedio obtenidos: 0.01, 0.03 y 0.02 L CH₄/Lr-d, respectivamente.

El tratamiento de vinazas, independientemente de su procedencia, representa una excelente alternativa para la producción de biogás. Se han realizado estudios con vinazas de caña de azúcar (Gomes de Barros et al., 2016) y de residuos de banano (España-Gamboa et al., 2012), por ejemplo, para evaluar su potencial para la producción de metano empleando distintos valores de carga orgánica volumétrica y de TRH.

Derivado de dichas investigaciones, se han obtenido resultados prometedores en donde la calidad del biogás es de hasta 85%. Un ejemplo de ello, son los datos reportados por Gomes de Barros y colaboradores, quienes implementaron distintas condiciones en dos reactores UASB inoculados con lodo granular para conseguir la mejor producción de metano. Entre sus observaciones, advirtieron que, bajo las cargas orgánicas de 7.5 y 11.5 g DQO/L-d (las más altas evaluadas), el porcentaje de metano en el biogás disminuyó, pero al mismo tiempo, se alcanzó la mejor productividad del mismo en cada reactor: 0.8 y 1.3 L CH₄/Lr-d, con un TRH de 2.8 y 1.8 días, respectivamente. Además, sugieren que es posible reducir los efectos de choques de carga y prevenir la flotación de gránulos manteniendo una relación adecuada en la suplementación de nitrógeno, fósforo y potasio (Gomes de Barros et al., 2016).

En otro trabajo, se obtuvieron los mejores resultados al emplear una carga orgánica volumétrica de 17.05 g DQO/L-d de vinazas de residuos de banano sin diluir en un reactor UASB modificado, con un tiempo de residencia hidráulica de 7.5 días. Los valores correspondientes al rendimiento de metano, su contenido en el biogás y la proporción removida de la materia orgánica fueron: 0.263 L CH₄/ g DQO añadido, 84% y 69%, respectivamente. Para evaluar el desempeño del reactor, se aplicaron tasas más altas de COV (18.55 y 22.16 g DQO/L-d), pero lamentablemente, el sistema colapsó con la última (España-Gamboa et al., 2012).

En un reactor de lecho empacado a escala piloto, se confirmó la existencia de la relación proporcional entre la concentración de la carga orgánica volumétrica y la producción de biogás mediante el tratamiento de vinazas tequileras. El incremento en el valor de COV (4 – 12.5 g DQO/L-d) se realizó mediante la reducción gradual del TRH (de 5 a 2 días). De esta manera, el mayor volumen de biogás (2640 L/d) y la productividad más alta de metano (3.03 L CH₄/L-d), se alcanzaron en la última etapa del experimento, bajo una carga orgánica de 12.5 g DQO/L-d. Por otro lado, la composición gaseosa del metano en el biogás se mantuvo constante, con un valor de 65 ± 3% durante el tiempo de operación del reactor, mientras que la eficiencia de remoción de la materia orgánica fue de 86.3% (Arreola-Vargas et al., 2018).

A fin de obtener una visualización representativa del volumen de metano y de hidrógeno contenido en el biogás en relación con la carga orgánica volumétrica en cada una de las etapas en las que se dividió el experimento de la presente investigación, los resultados de la media de los datos (puntos rojos refieren a metano y azules a hidrógeno) se despliegan en la **Figura 25**.

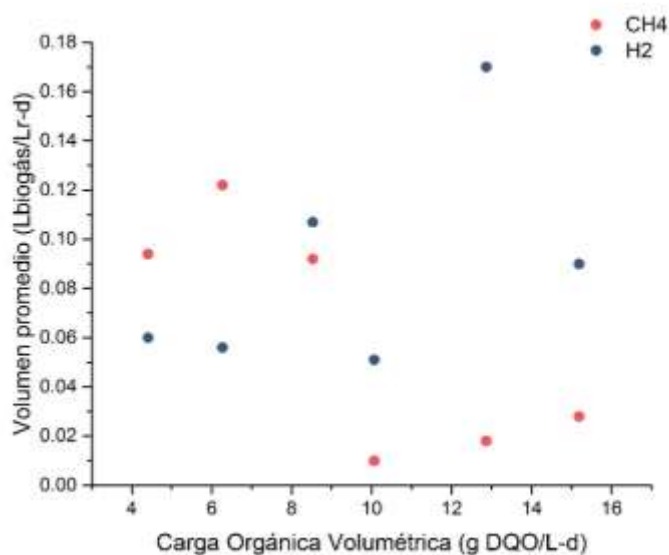


Figura 25. Gráfico del volumen promedio de biogás (H_2 y CH_4) en función de la carga orgánica volumétrica en el reactor UASB

A partir de la gráfica anterior, es posible apreciar el incremento de la presencia de hidrógeno en el sistema desde el tercer punto; es decir, cuando el valor de COV fue de 8.5 g DQO/L-d. El cambio mantiene una relación inversamente proporcional, en donde la abrupta disminución del contenido de metano se hace evidente.

Un aspecto fundamental a considerar en este tipo de sistemas es que una porción significativa de los gases que se producen durante procesos anaerobios suelen quedar disueltos en el líquido y, posteriormente, ser expulsados en el efluente tratado. En reactores UASB, la pérdida de metano en el efluente puede variar entre un 20 y 50% (Gomes de Barros et al., 2016).

De acuerdo con los resultados de los estudios previamente mencionados, en donde el principal objetivo fue la producción de metano empleando el mismo o sustratos similares al del presente trabajo, la mejor productividad se alcanzó aplicando valores de COV comprendidos entre 7.5 y 17.05 g DQO/L-d (Arreola-Vargas et al., 2018; España-Gamboa et al., 2012; Gomes de Barros et al., 2016); en cambio, en correspondencia con los datos del experimento aquí reportado, el valor óptimo de COV considerado (6.27 g DQO/L-d) se encuentra por debajo de los anteriores.

8.3.3. Perfil de comunidad bacteriana en UASB

Los gránulos que forman el lodo anaerobio son agregaciones fisicoquímicas de biomasa activa que comprenden un gran número de poblaciones microbianas, en donde cada una mantiene una función definida. Generalmente, un gránulo está compuesto por bacterias del género *Methanosaeta* spp., polímeros extracelulares secretados por microorganismos hidrogenótrofos y depósitos inorgánicos, así como proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos que, en conjunto, poseen una alta tasa de actividad metanogénica (Nnaji, 2013).

Respecto a la identificación de la población microbiana del lodo anaerobio granular contenido en el UASB, al análisis mostró que los géneros predominantes fueron *Prevotella*, *Sporolactobacillus* y *Clostridium*, resultados similares a los obtenidos en la biopelícula de los carriers del CSTR. Por otro lado, en menor grado, el único metanogénico notable fue *Methanobacterium* (Muñoz-Estrada, 2021).

En la **Figura 26**, se presenta la abundancia relativa de los géneros de microorganismos encontrados en las muestras analizadas durante cada etapa.

De acuerdo con la gráfica, la presencia de *Methanobacterium* es principalmente perceptible en las etapas I y II, lo que explicaría la disminución de la producción de metano a partir de la etapa III. Al mismo tiempo, puede observarse que bacterias pertenecientes a los géneros *Clostridium* y *Sporolactobacillus* se mantuvieron constantes a lo largo del experimento, revelando un ligero incremento en la etapa IV y con niveles similares en las etapas siguientes.

Por otro lado, la participación microbiana de *Bifidobacterium* se hizo notar a finales de la etapa II, momento desde el cual comenzó a incrementar el número de su población hasta superar el 10% de abundancia relativa en las etapas III, V y VI.

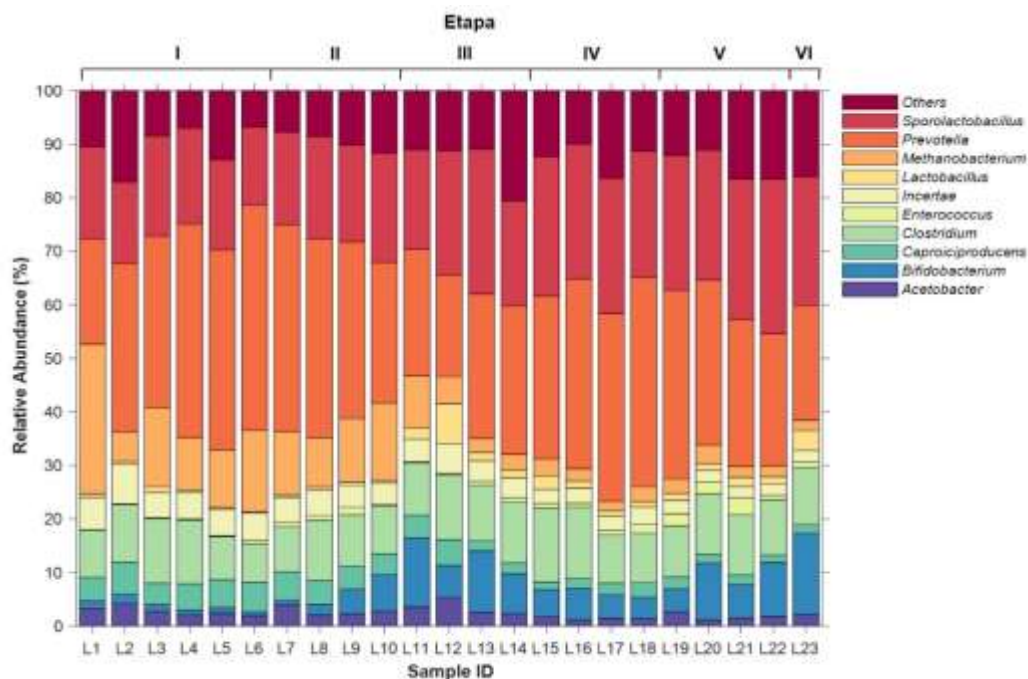


Figura 26. Gráfico de la abundancia relativa de los microorganismos del lodo anaerobio granular identificados en cada etapa experimental. Modificado de Muñoz-Estrada, 2021

Los metanógenos se distinguen por tener la capacidad de metabolizar dos tipos de sustrato: hidrógeno (hidrogenotróficos) y acetato (acetoclásticos) para la producción de metano. En este sentido, *Methanobacterium* y *Methanosaeta* son dos de los géneros más representativos en cada caso. De acuerdo con estudios basados en el metabolismo de este tipo de microorganismos, la mejor productividad se alcanza cuando las rutas hidrogenotrófica y acetoclástica ocurren de manera simultánea (Arreola-Vargas et al., 2018; Volpini et al., 2018).

8.3.4. Producción de energía en reactor UASB

En la **Tabla 9**, se concentra la información respecto a la energía promedio generada en cada una de las etapas en función de la concentración de la carga orgánica volumétrica aplicada. Al inicio, puede percibirse un incremento paralelo entre ambas condiciones, pero a partir de la etapa III, la cantidad de energía varía de manera independiente al valor de COV.

Tabla 9. *Media de la energía producida en el reactor UASB en relación con los diferentes valores de carga orgánica volumétrica empleados*

Etapa	I	II	III	IV	V	VI
Carga orgánica volumétrica (g DQO/L-d)	4.4	6.3	8.5	10.1	15.2	12.9
Energía (J/Lr-d)	3.46	4.28	3.82	0.78	1.70	2.11

La representación gráfica de la energía que se generó diariamente en el UASB, se muestra en la **Figura 23**.

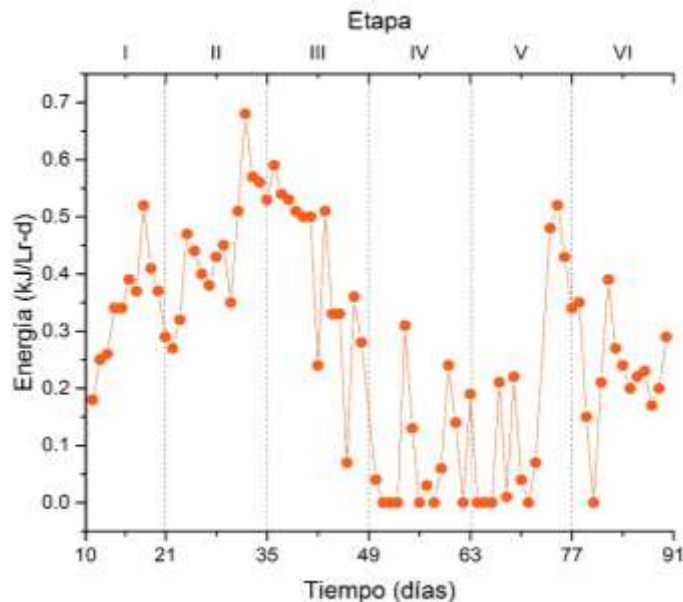


Figura 27. *Gráfico de la producción de energía generada en el reactor UASB*

De acuerdo con la gráfica previa, puede destacarse que la mayor producción de energía se obtuvo en la etapa II, alcanzando un valor promedio de 4.28 J/Lr-d. Además, en dicha etapa también se registró el pico más alto, con una cantidad total de 683.18 J/Lr-d.

Por el contrario, en las etapas IV y V, es posible visualizar una disminución de la misma; no obstante, la producción volvió a recuperarse a partir del día 74, precisamente un día después de reparar la fuga en el reactor.

Durante algunos días, el dispositivo μ Flow® no detectó aumento en el volumen del biogás, es por ello que, en la gráfica, hay días en los que la producción de energía fue completamente nula; a pesar de ello, al descartar dichos datos, el menor pico (14.34 J/Lr-d) corresponde a la etapa V.

En general, los resultados obtenidos no fueron precisamente altos ya que todos los valores se encontraron por debajo de 1 kJ; en contraste, por ejemplo, con los datos reportados por Arreola-Vargas y colaboradores, quienes registraron una producción diaria de energía de 48.3 MJ al aplicar la máxima tasa de producción volumétrica de metano (12.5 g DQO/L-d), considerando que su equivalente de energía es de 35.8 kJ/L. En este caso, es necesario tomar en cuenta que el reactor utilizado fue a escala piloto, con un volumen de trabajo de 445 L (Arreola-Vargas et al., 2018).

8.4. Producción de biogás en el sistema de reactores

La separación del proceso de digestión anaerobia en dos etapas (acidogénesis y metanogénesis) brinda numerosos beneficios al sistema en general, volviéndolo más eficiente en el rendimiento del biogás y en la tasa de recuperación de energía, además de mejorar su estabilidad y la calidad del digestato. Esto es posible siempre que se mantenga el control adecuado de los reactores en los que se efectúan las interacciones microbianas al entrar en contacto con la materia prima, ya que las inestabilidades que se producen en la etapa hidrogenogénica pueden ocasionar alteraciones en el reactor metanogénico debido a la interrupción de la disponibilidad de precursores de metano (Fu et al., 2017; García-Depraect et al., 2020).

La cuantificación total de biogás concerniente a cada etapa del experimento, se encuentra en la **Tabla 10**. Con base en los resultados, es posible identificar dos periodos en los que el volumen del biogás iba en aumento: etapas I y IV, en esta última se presentó una disminución en relación con la etapa anterior, pero poco a poco, el nivel fue incrementando, aunque no superó el volumen alcanzado en las etapas II y III. El mayor volumen en el sistema se obtuvo durante la etapa III, con un total de 63.3 NL, equivalente a 4.52 NL por día

Tabla 10. Registro del volumen acumulado de biogás producido en el sistema de reactores durante cada etapa del experimento

Etapa	I	II	III	IV	V	VI
DQO (g/L)	10	15	20	25	30	32
Volumen de biogás (NL)	36.2	58.3	63.3	32.4	34.7	37.3

La representación gráfica del volumen de biogás que se produjo diariamente en ambos reactores, se puede visualizar en la **Figura 28**.

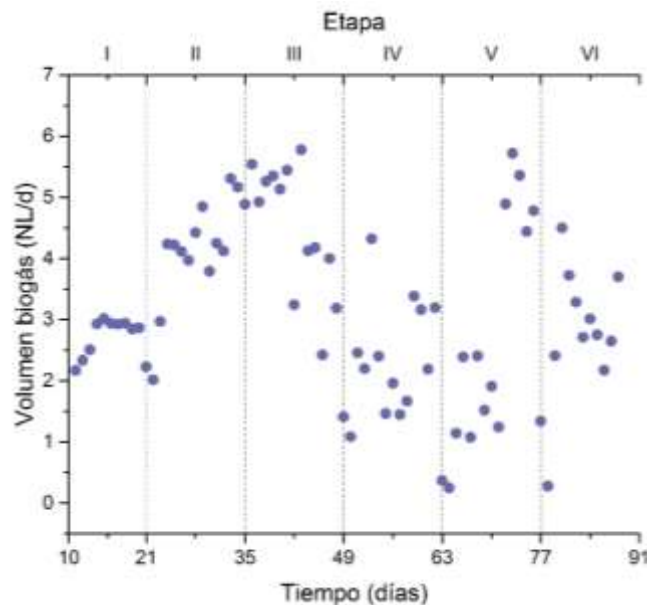


Figura 28. Gráfico de la producción de biogás generado en el sistema de reactores durante los tres meses de duración del experimento

Al principio del experimento, es evidente la tendencia ascendente, misma que se mantuvo durante 43 días; sin embargo, la producción comenzó a disminuir a partir de la segunda mitad de la etapa III, provocando una alta variación en el volumen de biogás generado durante los días siguientes. Este hecho es atribuible tanto a los problemas técnicos que se presentaron en el UASB como a la inhibición por sustrato que pudo generarse al emplear cargas orgánicas por encima de 100 g DQO/L-d, en el caso del CSTR.

La aportación más importante que proporciona este trabajo es el acoplamiento de los reactores, en donde, de manera simultánea, se produce hidrógeno y metano. En otros estudios, este proceso se realiza por separado, almacenando el efluente del primer reactor y, posteriormente, utilizándolo para alimentar el segundo. Un ejemplo de ello es la investigación desarrollada por Buitrón y colaboradores, quienes utilizaron reactores con configuraciones SBR (reactor biológico secuencial) y UASB empleando vinazas tequileras como sustrato. De acuerdo con sus resultados, las productividades fueron de 1.38 ± 0.09 L H₂/L-d y de 0.3 ± 0.02 L CH₄/L-d cuando los valores de COV fueron de 16 y de 1.64 g DQO/L, respectivamente, empleando tiempos de residencia hidráulica de 6 h (TBR) y de 24 h (UASB). En general, la remoción de materia orgánica fue de 73 – 75% (Buitrón et al., 2014b).

Con relación al estudio descrito anteriormente y en comparación con el aquí reportado, se debe hacer hincapié en las diferencias sobre las cargas orgánicas evaluadas ya que, en este caso, los mejores resultados se obtuvieron aplicando 108.34 y 6.27 g DQO/L-d en el CSTR y en el UASB, respectivamente, alcanzando una producción de hidrógeno de 2.2 L H₂/L-d y de metano de 0.12 L CH₄/L-d.

En un análisis comparativo que se llevó a cabo en lote para evaluar la producción de biogás a través del proceso de digestión anaerobia en una y dos etapas, se determinó que tanto el rendimiento acumulativo de metano como la eficiencia de remoción de sólidos volátiles y de la materia orgánica soluble fueron superiores en el procedimiento de dos etapas, representando un incremento del 10.8, 10.4 y 3.7% en comparación con los resultados obtenidos en la fermentación de una sola etapa (Fu et al., 2017).

8.4.1. Producción de energía total

La correlación numérica entre la concentración de DQO en la vinaza de alimentación y la energía promedio que se produjo en el sistema durante cada etapa, se presenta en la **Tabla 11**. A partir de ésta, se observa que no hay una tendencia clara en la generación de energía, aunque los valores más altos se centran dentro de las primeras tres etapas.

Tabla 11. *Media de la energía total producida en el sistema de reactores*

Etapa	I	II	III	IV	V	VI
DQO (g/L) vinaza	10	15	20	25	30	32
Energía total (kJ/Lr-d)	1.48	2.52	2.64	2.03	1.35	0.67

En la **Figura 29**, se muestra tanto la energía total generada en el sistema como la que se produjo en cada uno de los reactores. De acuerdo a la simbología, los puntos azules refieren a la suma de la energía de ambos con base en el volumen operacional de cada uno, y los de color verde y naranja a la del CSTR y UASB, respectivamente.

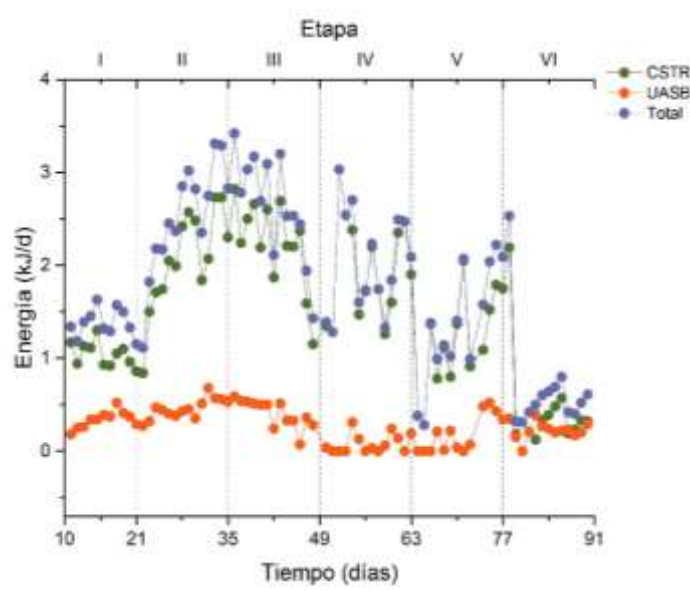


Figura 29. *Gráfico de la producción de energía generada en el sistema de reactores*

El mayor pico de energía se obtuvo en la etapa III, al utilizar la vinaza de alimentación a una concentración de 20 g DQO/L, correspondiente con un valor de 3.42 kJ/d. Durante dicha etapa se alcanzó una productividad promedio de 2.64 kJ/d, que representa la máxima energía producida en el sistema.

Bajo el contexto de la generación de energía dividiendo el proceso en dos fases (hidrógeno + metano), Volpini y colaboradores aseguran que, en este tipo de sistemas, la producción es superior en comparación con la obtenida en procedimientos de una sola etapa. Su estudio se basó en la generación de biometano en un reactor AnSBBR (reactor anaerobio operado en secuencia por lote y por lote alimentado utilizando biomasa inmovilizada) mediante el tratamiento del efluente de la producción de hidrógeno aprovechando vinazas de caña de azúcar como sustrato. De acuerdo con sus resultados, la cuantificación de energía fue 38.8% más alta en el sistema de dos etapas, alcanzando 13.7 kJ/g DQO_{aplicado} en contraste con 9.8 kJ/g DQO_{aplicado}, total de energía producida en una sola etapa (Volpini et al., 2018).

Hallazgos similares han sido previamente reportados: en comparación con la fermentación de una sola etapa, la recuperación de energía dividiendo el proceso en dos, fue 12.9% mayor, al obtener 10.54 kJ/g SV_{sustrato} (Fu et al., 2017). Por otro lado, utilizando bagazo de agave, se demostró que la eficiencia de conversión de energía aumentó 56% a través del proceso secuencial de la obtención de hidrógeno y metano, alcanzando 9.2 kJ/g bagazo (Montiel Corona & Razo-Flores, 2018).

De igual manera, con base en el cálculo del balance de masa correspondiente, se estima que un litro de vinazas tequileras (42.2 g DQO/L) podría producir un total de 3.1 y de 6.5 L de biogás rico en hidrógeno y metano con un contenido de 90.7 y 68.5%, respectivamente. De esta manera, la tasa de energía producida podría alcanzar hasta 267.46 kJ/L_{vinaza} (García-Depraect et al., 2020).

8.5. Remoción de fenoles totales y de materia orgánica (DQO)

Adicional a la producción de determinado gas de interés tras la puesta en marcha de un proceso anaerobio, otro de los resultados inminentes que se obtienen es la remoción total o parcial de los contaminantes presentes en el agua residual cuya composición puede llegar a ser muy variada dependiendo el proceso industrial del que proceda (Vacca et al., 2008). De esta manera, es conveniente afirmar que la obtención de energía en forma de biogás y la biorremediación, que se ha convertido en una alternativa viable tanto para el desarrollo de nuevos sistemas de depuración para aguas residuales como para la optimización de los convencionales, son procesos que se encuentran directamente relacionados (Barrera & Zafra, 2018).

Uno de los contaminantes orgánicos con mayor presencia en aguas residuales es el fenol y sus derivados sustitutos, que resaltan por su alta toxicidad, incluso cuando su concentración se encuentra dentro de los límites adecuados. Químicamente, se caracterizan por ser hidrocarburos aromáticos semivolátiles que comprenden un grupo fenilo ($-C_6H_5$) unido a grupos hidroxilos (OH^-). De acuerdo con diversos registros, la detección de este compuesto en aguas residuales se encuentra dentro del rango entre 1 y 7000 mg/L en la mayoría de las industrias (Mohd, 2020).

Las técnicas de tratamiento implementadas para la remoción de fenoles incorporan tecnologías fisicoquímicas (extracción por solvente, adsorción utilizando diversos materiales y oxidación química con diversos agentes, por mencionar algunas) y procesos biológicos (aerobios y anaerobios). Es necesario hacer especial hincapié en estos últimos ya que se ha fomentado su uso debido a las ventajas que presentan en comparación con métodos fisicoquímicos al ser más amigables en términos económicos y ambientales (Mohd, 2020; Tomei et al., 2021).

Por otro lado, la Demanda Química de Oxígeno es una medida utilizada para conocer la cantidad de oxígeno que se requiere en el proceso de oxidación de los contaminantes orgánicos, mismos que son transformados a productos finales estables (Zhang et al., 2012). En la realización de este estudio, se evaluaron distintas muestras del efluente del CSTR y del UASB para determinar la eficiencia de degradación de la materia orgánica contenida en la vinaza de alimentación.

8.5.1. Fenoles totales

La implementación de un tratamiento anaerobio ofrece numerosas ventajas debido a la baja producción de lodo que presenta, a la ausencia de requerimientos de adición de químicos durante el proceso y a la oportunidad de restitución de recursos valiosos como nutrientes; aunque, en comparación con el aerobio, las cinéticas son más lentas, las concentraciones del efluente son más altas y los microorganismos involucrados, especialmente metanógenos, son fuertemente afectados por la toxicidad de algunos compuestos, como los fenoles (Tomei et al., 2021).

En la **Tabla 12**, se muestran los datos respecto a la concentración teórica del contenido de fenoles totales que entraba al sistema en relación con la carga orgánica de la vinaza de alimentación ajustada en cada etapa.

Tabla 12. Concentración teórica de fenoles totales a la entrada del sistema de reactores durante cada etapa experimental

Etapa	DQO (g/L) vinaza	Carga orgánica volumétrica (g DQO/L-d)	Lote vinaza de alimentación	Fenoles totales (mg/L)
I	10	56.05	1	40
			2	37.8
I	15	79.6	3	56.7
				48.1
III	20	108.34	3	64.1
IV	25	127.92		80.1
V	30	192.97	4	82.5
VI	32	163.53	5	21.2
			6	4.8

La cuantificación de fenoles totales presentes en los lotes de vinaza utilizados y en las muestras analizadas, se puede apreciar en la **Figura 30**.

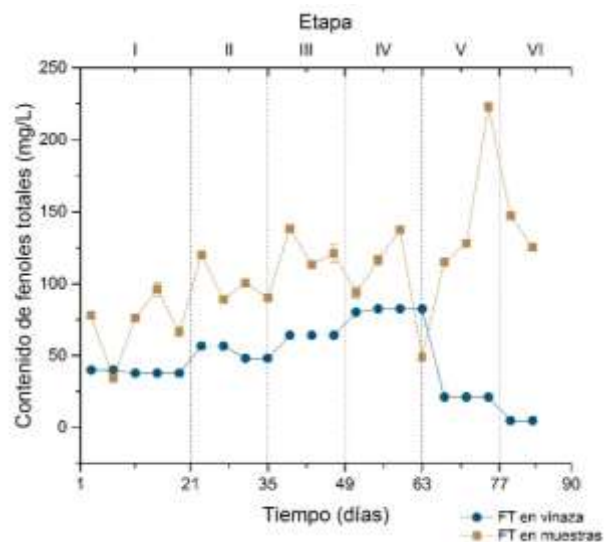


Figura 30. Gráfico de la relación entre el contenido de fenoles totales presentes en vinaza y en las muestras extraídas del reactor CSTR

Con base en los resultados anteriores, es posible observar la evidente variación de la concentración de fenoles totales de los lotes de las etapas V y VI. En general, no hubo remoción de estos compuestos en ninguna de las etapas ya que, en la mayoría de los casos, el contenido en las muestras fue más elevado que el de la entrada. Respecto a esto, es probable que la concentración teórica de fenoles totales haya diferido de la real o, bien, que hayan sido adsorbidos en la biopelícula que se formó en los carriers; sin embargo, sería fundamental la realización de análisis posteriores en la misma para determinar o descartar su presencia y concentración.

El desempeño de los consorcios en la biodegradación metabólica se puede ver seriamente afectado debido a la presencia de compuestos tóxicos en el agua residual generando la inhibición de los microorganismos y, a su vez, la disminución de la producción de hidrógeno. Por ejemplo, mediante la desactivación de enzimas que intervienen en la hidrólisis lignocelulósica, concentraciones de fenoles entre 0.12 y 50 mg/L son suficientes para inhibir la actividad de bacterias y hongos que participan en la transformación de etanol a partir de la fermentación de carbohidratos (Buitrón & Carvajal, 2010; Rodríguez-Félix et al., 2018).

Bajo el argumento anterior, es importante mencionar que el mayor contenido de fenoles totales en las muestras se obtuvo en las etapas V y VI, lo que podría relacionarse con los bajos porcentajes de hidrógeno que se obtuvieron en dichas etapas (**Figura 11**), alcanzando 85.2 y 83.4%, respectivamente.

Este tipo de compuestos actúan directamente sobre las bacterias fermentativas ocasionando el incremento de la permeabilidad de sus membranas celulares, la disminución del crecimiento celular, la supresión de las actividades microbianas e, incluso, la alteración de las rutas metabólicas, lo que repercute de manera negativa sobre la producción de hidrógeno (Carrillo-Reyes et al., 2019).

Generalmente, durante el proceso de digestión anaerobia, las poblaciones microbianas difieren con las que fueron inoculadas en un inicio debido a la constante modificación que experimentan al adaptarse a las condiciones impuestas. De esta manera, la morfología de la comunidad, en el caso de gránulos anaerobios, y su metabolismo son aspectos clave en las tasas de remoción (Tomei et al., 2021).

En el caso específico de la biodegradación de compuestos aromáticos como el fenol, las bacterias reductoras de nitrato, hierro y sulfato cobran especial importancia, destacando *Rhodopseudomonas palustris*, *Magnetospirillum* spp., *Thauera aromatica*, *Azoarcus* spp., *Geobacter metallireducens* y *Syntrophus aciditrophicus*, al haber sido las primeras bacterias en ser caracterizadas química y genéticamente (Tomei et al., 2021).

En una investigación realizada por Fang y colaboradores, se empleó un reactor UASB para tratar agua residual alterada deliberadamente con fenol, se evaluó la degradación del contaminante y se distinguieron algunas bacterias capaces de utilizar los compuestos aromáticos como donadores de electrones, entre ellas, sobresalió *Clostridium* que, junto con *Desulfotomaculum*, fueron los precursores en la ruta metabólica de la degradación anaerobia del compuesto a través de su conversión a benzoato, transformándolo posteriormente a acetato, H₂ y CO₂ con la participación del género *Syntrophus* para conseguir metano como producto final gracias a la acción de los metanógenos (Fang et al., 2004).

La descripción anterior corresponde a la conversión del fenol a otros productos por vía 4-hidroxibenzoato. Otra de las rutas metabólicas que se encuentra implicada en dicho proceso es la del caproato, con la diferencia de que ésta se efectúa bajo condiciones termófilas (55 °C) y da lugar a la obtención de ácidos grasos como resultado final de la oxidación (Tomei et al., 2021).

Se han utilizado diferentes configuraciones de reactores para la remoción de fenoles por medio de la digestión anaerobia empleando, en todos los casos, valores de TRH prolongados, manteniéndose alrededor de 0.25 y 23.5 días, puesto que la completa degradación del compuesto se lleva a cabo hasta alcanzar la etapa de metanogénesis (Tomei et al., 2021).

El análisis de la concentración de fenoles en este experimento fue realizado en las muestras extraídas del CSTR, reactor utilizado para la producción de hidrógeno y adecuado a un TRH de 4 h. Posiblemente, ésta fue la razón de la baja remoción de fenoles, aunado al hecho de que la vinaza contenía una elevada cantidad de azúcares, mismos que fueron utilizados como la principal fuente de carbono. Vacca y colaboradores obtuvieron resultados similares al evaluar la remoción de compuestos fenólicos e hidrocarburos saturados en un reactor UASB a un TRH de 24 h, aunque los resultados fueron alentadores, no se logró una remoción satisfactoria ni de los compuestos fenólicos ni de la DQO sugiriendo la aplicación de un tratamiento secundario que permita alcanzar niveles permitidos de este contaminante en el efluente (Vacca et al., 2008).

8.5.2. Cuantificación de DQO en ambos reactores

La carga orgánica volumétrica es un factor clave en la operación de un reactor ya que el valor que se le otorgue repercutirá directamente sobre la eficiencia de remoción de la materia orgánica, de manera que esta última puede disminuir cuando se incrementa la primera (Gomes de Barros et al., 2016).

En la **Figura 31**, se representa el contenido de la concentración de DQO inicial y de los resultados obtenidos en las muestras extraídas de ambos reactores.

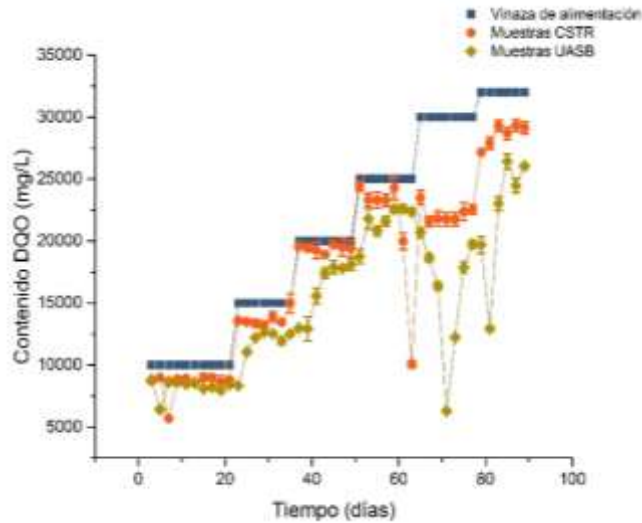


Figura 31. Gráfico de la concentración de DQO en vinaza de alimentación y en muestras extraídas de ambos reactores

De manera general, los dos reactores exhibieron un comportamiento similar sobre la eficiencia de remoción de DQO; no obstante, es importante señalar que, durante las etapas I y IV, hubo días en los que el nivel de materia orgánica fue mayor en el UASB que en el CSTR. Dicho acontecimiento únicamente se presentó durante esas etapas y en un número limitado de ocasiones, repitiéndose un total de 5 veces.

Asimismo, es posible visualizar que, durante las etapas I, II y III, el contenido de DQO de las muestras extraídas era muy cercano al de la concentración orgánica de la vinaza de alimentación destacando la primera (UASB) y la tercera (CSTR), en las que se registró el nivel más bajo de eliminación de materia orgánica con un porcentaje de remoción de 3.58 y 3.01%, respectivamente.

Los datos que se reflejan en la gráfica también demuestran que la concentración de DQO a la salida del sistema se mantiene en niveles por encima de 6 g DQO/L, poniendo en evidencia la baja remoción de DQO en el sistema. Acorde con esto, es importante mencionar que una pequeña fracción de la materia orgánica eliminada, aproximadamente el 10%, es integrada en lodos (Gomes de Barros et al., 2016).

En promedio, la mayor remoción de DQO ocurrió en la etapa V con un total de 26.03% en el CSTR y de 28.3% en el UASB.

La información detallada se muestra en la **Figura 32**, en donde, en términos de porcentaje, se presenta la proporción de materia orgánica removida durante cada etapa del experimento tanto en el CSTR, con relación al nivel de DQO de la vinaza de alimentación, como en el UASB, respecto al de la vinaza contenida en el primer reactor.

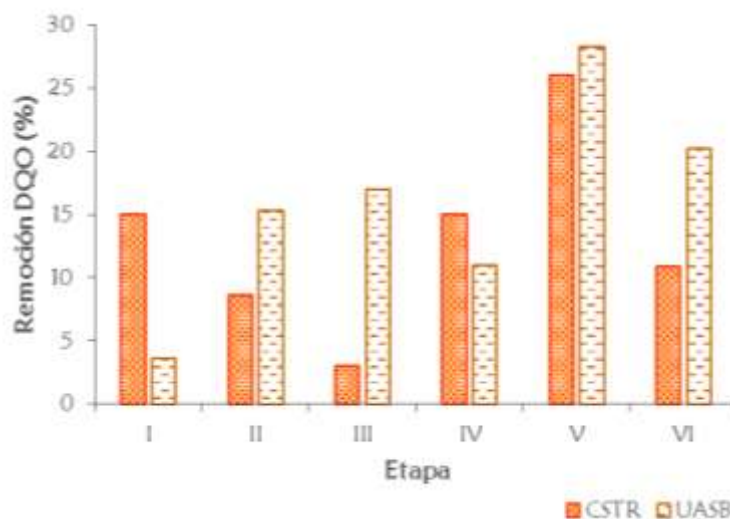


Figura 32. Gráfico del porcentaje de remoción de DQO en los reactores CSTR y UASB durante las diferentes etapas del experimento

Es importante señalar la posibilidad de que los flujos irregulares que ocasionó la fuga de la chaqueta hidráulica en el reactor metanogénico fuera la razón por la que los niveles más altos de eliminación de la materia orgánica (DQO), con respecto a las muestras del efluente del UASB, se registraran en las etapas V y VI.

Como se mencionó en la sección 8.3.2, el mejor resultado respecto a la producción volumétrica de metano se alcanzó en la etapa II, al alimentar el UASB a una carga orgánica de 6.27 g DQO/L-d. Durante dicha etapa, el nivel de materia orgánica removida fue bajo (15.3%) en comparación con la eficiencia de remoción de más del 65% obtenida en otros trabajos bajo los valores óptimos de COV considerados: 7.5 y 11.5 g DQO/L-d (Gomes de Barros et al., 2016), 17.05 g DQO/L-d (España-Gamboa et al., 2012) y 12.5 g DQO/L-d (Arreola-Vargas et al., 2018).

De acuerdo con el análisis de DQO de las muestras provenientes de ambos reactores, no se observó ningún tipo de asociación entre el incremento gradual de COV y la remoción de DQO. En realidad, el comportamiento de esta última no fue consistente en orden ascendente ni descendente, contrario a lo que afirman Gomes de Barros y colaboradores que, según sus resultados, la efectividad de remoción disminuía conforme el nivel de COV aumentaba (Gomes de Barros et al., 2016).

Con el propósito de disminuir la concentración de DQO en el efluente, es necesario considerar la implementación de procesos alternativos, como la operación del sistema bajo condiciones termófilas ya que, de este modo, es posible aplicar valores de COV más altos y así mejorar la remoción de la materia orgánica y el rendimiento de la producción de metano; o bien, mediante la combinación de tecnología aerobia y métodos anaerobios (Arreola-Vargas et al., 2018; Gomes de Barros et al., 2016).

Pese a que el objetivo principal del sistema de reactores montado en este experimento no es la eliminación del contenido de compuestos orgánicos presente en la materia prima sino la producción de biogás, resulta conveniente hacer uso de la información obtenida ya que podría suponer una apertura hacia la consideración de nuevas opciones al implementar dos o más tratamientos en el proceso para alcanzar más de un propósito. En este sentido, se ha demostrado que existe una relación entre la concentración orgánica de entrada y el TRH de modo que, entre más alto sea el valor de éste, habrá una mayor eficiencia de remoción a altas cargas orgánicas debido al incremento de microorganismos y a su actividad metabólica, proporcionando así el tiempo de contacto suficiente para la biodegradación de la materia orgánica (Kawan et al., 2016; Majid & Mahna, 2019).

En relación con la información de la **Figura 32**, aunque no fue en una proporción muy notoria, la mayor remoción de DQO se efectuó en el reactor UASB, lo que podría atribuirse a que éste tenía un tiempo de residencia hidráulico superior que el del CSTR.

Otro de los parámetros que cobra importancia en la eficiencia de remoción orgánica, es la temperatura. En sistemas que emplean biopelículas microbianas, es recomendable mantener el sistema bajo condiciones mesofílicas con la finalidad de propiciar el crecimiento de los microorganismos; sin embargo, en un estudio sobre el tratamiento de aguas industriales en el que se emplearon carriers de polietileno del tipo K3 en un biorreactor de lecho móvil a escala de laboratorio, se reportó que la operación del sistema por encima de 27 °C provocó la disminución de remoción orgánica debido a la reducción de la transferencia de masa ocasionada por el aumento en el espesor de la biopelícula (Majid & Mahna, 2019).

Aunque los resultados de investigaciones previas sugieran cambios en los tiempos de residencia hidráulica y de la temperatura a la que debe permanecer el sistema para asegurar una mayor remoción de carga orgánica, en este caso, no es posible atender o implementar estas opciones ya que la prioridad al realizar el experimento fue la obtención de biocombustible (H_2 y CH_4).

9. CONCLUSIONES

El análisis de la composición de las vinazas permite conocer la cantidad de materia orgánica que entra al sistema, lo que repercute de manera directa sobre la disponibilidad de los recursos que tienen los microorganismos para llevar a cabo las actividades metabólicas que propicien la producción de biogás.

La predominancia de bacterias ácido lácticas sobre la población de *Clostridium*, sugiere la utilización de hidrógeno como fuente de sustrato debido al bajo aprovechamiento de azúcares totales a lo largo del experimento y a la disminución del uso de azúcares reductores en las etapas V y VI. Por otra parte, no se detectó la presencia de bacterias reductoras de fenoles, por lo que no hubo registro de su remoción durante el experimento.

La remoción de DQO se mantuvo en un rango entre 3 y 28.3% en ambos reactores, presentando una mayor remoción en el UASB.

Los mejores resultados respecto al volumen acumulado de biogás (26.6 NL) en el CSTR, la productividad de hidrógeno (2.24 L H₂/Lr d), su composición en el biogás (85.4%) y el promedio de energía más alto registrado (1.65 kJ/Lr-d), se obtuvieron durante la etapa III, bajo una carga orgánica de 108.3 g DQO/L-d; sin embargo, en la etapa II (79.6 g DQO/L-d), se observó una tendencia ascendente en la producción de biogás y de hidrógeno, misma que decayó en la segunda mitad de la etapa III.

En el UASB, la producción volumétrica más alta de metano (0.122 L CH₄/Lr-d), su contenido en el biogás (48.2%) y la mayor cuantificación de energía (4.28 J/Lr-d) se alcanzó en la etapa II (6.3 g DQO/L-d); aunque el mayor volumen acumulado de biogás (36.7 NL), se generó en la etapa III (8.5 g DQO/L-d), presentando un descenso en la producción a partir de la segunda mitad de dicha etapa.

En el sistema general, se registró el mayor volumen de biogás (63.3 NL) y la mejor producción de energía (2.64 kJ/Lr-d) durante la etapa III, bajo una concentración orgánica de 20 g/L de vinazas tequileras.

10. PROSPECTIVAS

La producción de biogás de manera paralela abre una brecha para la obtención de hidrógeno y de metano aprovechando un mismo residuo; sin embargo, es necesario la implementación y posterior evaluación de otras estrategias acopladas al sistema propuesto en esta investigación:

- Adaptación de una etapa enfocada a la producción de lactato con el fin de aumentar la tasa de hidrógeno y, de esta manera, mejorar la cantidad de energía recuperada
- Asegurar un flujo uniforme ascendente del líquido contenido en el reactor metanogénico para favorecer un tiempo de residencia hidráulica homogéneo que concuerde con el establecido para el proceso
- Análisis del proceso de metanogénesis manteniendo valores de temperatura superiores a 40 °C a fin de propiciar un sistema termófilo para aumentar la producción del biogás y la posterior recuperación de energía
- Combinación de tratamientos aerobios enfocados en la remoción de materia orgánica presente en el agua residual
- Realización de futuros estudios para conocer cuáles son y en qué cantidad se encuentran los diferentes metabolitos generados por las bacterias en el reactor CSTR

11. BIBLIOGRAFÍA

- AA.VV. (2003). *Diccionario Oxford / Complutense. Química. 3ª edición.* (pp. 66). España: Complutense, S. A.
- Arellano-García, L., Velázquez-Fernández, J. B., Macías-Muro, M., & Marino-Marmolejo, E. N. (2021). Continuous hydrogen production and microbial community profile in the dark fermentation of tequila vinasse: Response to increasing loading rates and immobilization of biomass. *Biochemical Engineering Journal*, 172(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108049>
- Arreola-Vargas, J., Jaramillo-Gante, N. E., Celis, L. B., Corona-González, R. I., González-Álvarez, V., & Méndez-Acosta, H. O. (2016). Biogas production in an anaerobic sequencing batch reactor by using tequila vinasses: Effect of pH and temperature. *Water Science and Technology*, 73(3), 550–556. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.520>
- Arreola-Vargas, J., Snell-Castro, R., Rojo-Liera, N. M., González-Álvarez, V., & Méndez-Acosta, H. O. (2018). Effect of the organic loading rate on the performance and microbial populations during the anaerobic treatment of tequila vinasses in a pilot-scale packed bed reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 93(2), 591–599. <https://doi.org/10.1002/jctb.5413>
- Baird, C. (2001). *Química ambiental.* (pp. 439). Barcelona, España: Reverté.
- Balachandar, G., Varanasi, J. L., Singh, V., Singh, H., & Das, D. (2020). Biological hydrogen production via dark fermentation: A holistic approach from lab-scale to pilot-scale. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(8), 5202–5215. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.09.006>
- Barrera, Ó., & Zafra, C. (2018). Factores clave en procesos de biorremediación para la depuración de aguas residuales. Una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 573–585. <https://doi.org/10.31910/rudca.v21.n2.2018.1037>
- Bautista, J. M., García Oropeza, L., Salcedo Hernandez, R., & Parra Negrete, L. (2001). Azúcares en agaves (Agave tequilana Weber) cultivados en el estado de Guanajuato. *Acta Universitaria*, 11(1), 33–38.
- Bautista Justo, M., García Oropeza, L., Barboza-Corona, J. E., Parra Negrete, L. (2001). El Agave tequilana weber y la producción de tequila. *Acta Universitaria*, 2, 26–34.
- BBC News Mundo (2019). *Cambio climático: los gráficos animados que muestran los 15 países que más CO₂ emitieron en los últimos 20 años.* Recuperado de: <https://www.bbc.com/mundo/noticias-internacional-50811389>
- Buitrón, G., & Carvajal, C. (2009). Producción de hidrógeno a partir de aguas residuales. *Revista.Unam.Mx*, 10, 9. <http://www.revista.unam.mx/vol.10/num8/art50/art50.pdf>

- Buitrón, G., Prato-García, D., & Zhang, A. (2014). Biohydrogen production from tequila vinasses using a fixed bed reactor. *Water Science and Technology*, 70(12), 1919–1925. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.433>
- Buitrón, Germán, & Carvajal, C. (2010). Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 101(23), 9071–9077. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.127>
- Buitrón, Germán, Kumar, G., Martínez-Arce, A., & Moreno, G. (2014). Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H₂-SBR + CH₄-UASB) using tequila vinasses. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(33), 19249–19255. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.04.139>
- Buitrón, Germán, Muñoz-Páez, K. M., & Hernández-Mendoza, C. E. (2019). Biohydrogen production using a granular sludge membrane bioreactor. *Fuel*, 241(July 2018), 954–961. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.12.104>
- Carrillo-Reyes, J., Albarrán-Contreras, B. A., & Buitrón, G. (2019). Influence of Added Nutrients and Substrate Concentration in Biohydrogen Production from Winery Wastewaters Coupled to Methane Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(1), 140–151. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2812-5>
- Castelló, E., Nunes Ferraz-Junior, A. D., Andreani, C., Anzola-Rojas, M. del P., Borzacconi, L., Buitrón, G., Carrillo-Reyes, J., Gomes, S. D., Maintinguer, S. I., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Schiappacasse-Dasati, M., Tapia-Venegas, E., Valdez-Vázquez, I., Vesga-Baron, A., Zaiat, M., & Etchebehere, C. (2020). Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119(November). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>
- Cedeño, M. (1995). Tequila Production. *Critical Reviews in Biorechnology*, 15(1), 1–11.
- Consejo Regulador del Tequila (2021). *Producción Total: Tequila y Tequila 100%*. Recuperado de: <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>
- Cury R, K., Aguas M, Y., Martínez M, A., Olivero V, R., & Chams Ch, L. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 9(S), 122. <https://doi.org/10.24188/recia.v9.ns.2017.530>
- Daud, M. K., Rizvi, H., Akram, M. F., Ali, S., Rizwan, M., Nafees, M., & Jin, Z. S. (2018). Review of upflow anaerobic sludge blanket reactor technology: Effect of different parameters and developments for domestic wastewater treatment. *Journal of Chemistry*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1596319>

- Díaz-Cruces, V. F., García-Depraect, O., & León-Becerril, E. (2020). Effect of Lactate Fermentation Type on the Biochemical Methane Potential of Tequila Vinasse. *BioEnergy Research*.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Elbeshbishy, E., Dhar, B. R., Nakhla, G., & Lee, H. S. (2017). A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79(October 2015), 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>
- El País (2019). *Crisis climática: 2019 marcará máximos históricos de emisiones de CO₂ y temperaturas*. Recuperado de: https://elpais.com/sociedad/2019/12/03/actualidad/1575400446_816435.html
- España-Gamboa, E. I., Mijangos-Cortés, J. O., Hernández-Zárate, G., Maldonado, J. A. D., & Alzate-Gaviria, L. M. (2012). Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. *Biotechnology for Biofuels*, 5(May 2014). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-82>
- Espinoza-Escalante, F. M., Pelayo-Ortíz, C., Navarro-Corona, J., González-García, Y., Bories, A., & Gutiérrez-Pulido, H. (2009). Anaerobic digestion of the vinasses from the fermentation of Agave tequilana Weber to tequila: The effect of pH, temperature and hydraulic retention time on the production of hydrogen and methane. *Biomass and Bioenergy*, 33(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.04.006>
- Fang, H. H. P., Liu, Y., Ke, S. Z., & Zhang, T. (2004). Anaerobic degradation of phenol in wastewater at ambient temperature. *Water Science and Technology*, 49(1), 95–102. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0028>
- Ferreira-Rosa, P., & Luiz-Silva, E. (2016). Review of continuous fermentative hydrogen-producing bioreactors from complex wastewater. *Intech, i(tourism)*, 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Fu, S. F., Xu, X. H., Dai, M., Yuan, X. Z., & Guo, R. B. (2017). Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. *Process Safety and Environmental Protection*, 107(189), 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.01.024>
- García-Becerra, M., Macías-Muro, M., Arellano-García, L., & Aguilar-Juárez, O. (2019). Biohydrogen production from tequila vinasses: Effect of detoxification with activated charcoal on dark fermentation performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(60), 31860–31872. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.10.059>

- García-Depraect, O., & León-Becerril, E. (2018). Fermentative biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate-acetate pathway: Operational performance, kinetic analysis and microbial ecology. *Fuel*, 234(March), 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.06.126>
- García-Depraect, O., Muñoz, R., van Lier, J. B., Rene, E. R., Diaz-Cruces, V. F., & León-Becerril, E. (2020). Three-stage process for tequila vinasse valorization through sequential lactate, biohydrogen and methane production. *Bioresource Technology*, 307(January), 123160. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123160>
- García-Depraect, O., Rene, E. R., Diaz-Cruces, V. F., & León-Becerril, E. (2019). Effect of process parameters on enhanced biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate-acetate pathway. *Bioresource Technology*, 273(September 2018), 618–626. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.056>
- García, Y., Boucourt, R., Albelo, N., & Núñez, O. (2007). Inulin fermentation by lactic acid bacteria with probiotic characteristics. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 41(3), 251–254.
- Gomes de Barros, V., Duda, R. M., & Alves de Oliveira, R. (2016). Biomethane production from vinasse in upflow anaerobic sludge blanket reactors inoculated with granular sludge. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3), 628–639. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.021>
- Hafez, H., Nakhla, G., El, M. H., & Elbeshbishy, E. (2010). Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(1), 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.051>
- Hanna Instruments (2019). *Fósforo: Comprender los diferentes tipos de fósforo y los métodos utilizados para medirlo*. Recuperado de: <https://www.hannainst.es/blog/1504/F%C3%B3sforo--Comprender-los-diferentes-tipos-de-f>
- IEA (2020). *CO₂ Emissions from Fuel Combustion*. Recuperado de: <http://energyatlas.iea.org/#!/tellmap/1378539487>
- Jiménez, B. (2001). *La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada*. (pp. 133-134). México, D.F., México: Limusa S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores.
- Kane, J. W. & Sternheim M. M. (2007). *Física. 2ª edición*. (pp. 229). Barcelona, España: Reverté.
- Kawan, J. A., Abu Hasan, H., Suja, F., Jaafar, O., & Abd-Rahman, R. (2016). A review on sewage treatment and polishing using moving bed bioreactor (Mbbf). *Journal of Engineering Science and Technology*, 11(8), 1098–1120.

- Khan, M. A., Ngo, H. H., Guo, W., Liu, Y., Zhang, X., Guo, J., Chang, S. W., Nguyen, D. D., & Wang, J. (2018). Biohydrogen production from anaerobic digestion and its potential as renewable energy. *Renewable Energy*, *129*, 754–768.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.04.029>
- Laiq Ur Rehman, M., Iqbal, A., Chang, C. C., Li, W., & Ju, M. (2019). Anaerobic digestion. *Water Environment Research*, *91*(10), 1253–1271. <https://doi.org/10.1002/wer.1219>
- Le Quéré, C., Jackson, R. B., Jones, M. W., Smith, A. J. P., Abernethy, S., Andrew, R. M., De-Gol, A. J., Willis, D. R., Shan, Y., Canadell, J. G., Friedlingstein, P., Creutzig, F., & Peters, G. P. (2020). Temporary reduction in daily global CO₂ emissions during the COVID-19 forced confinement. *Nature Climate Change*, *10*(July), 647–654.
<https://doi.org/10.1038/s41558-020-0797-x>
- Li, Y., Chen, Y., & Wu, J. (2019). Enhancement of methane production in anaerobic digestion process: A review. *Applied Energy*, *240*(June 2018), 120–137.
<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.01.243>
- López-López, A., Davila-Vazquez, G., León-Becerril, E., Villegas-García, E., & Gallardo-Valdez, J. (2010). Tequila vinasses: Generation and full scale treatment processes. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, *9*(2), 109–116.
<https://doi.org/10.1007/s11157-010-9204-9>
- Lorenzo, Y., Obaya, M. C. (2006). La digestión anaerobia y los reactores UASB. Generalidades. *Icidca*, *XL*, 13–21.
- Mahabubur, M., & Md., R. (2012). Quantitative Chemical Defense Traits, Litter Decomposition and Forest Ecosystem Functioning. *Forest Ecosystems - More than Just Trees*, January 2011. <https://doi.org/10.5772/39003>
- Majid, A., & Mahna, M. (2019). Application of Lab-Scale MBBR to Treat Industrial Wastewater using K3 Carriers: Effects of HRT, High COD Influent, and Temperature. *International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources*, *20*(2), 35–42.
<https://doi.org/10.19080/ijesnr.2019.20.556031>
- Márquez, M., & Martínez, S. (2011). Reactores Anaerobios de Flujo Ascendente (RAFA's o UASB) Antología. *Centro Tecnológico Aragón*, 31.
- Martínez Reséndiz, L. I., Téllez Luis, S. J., Rodríguez Castillejos, G. C., Palos Pizarro, I., Efrén Nieto, M., & Cuarenta Obrajero, J. (2016). Producción de azúcares fermentables a partir del agave Tequilana weber variedad azul. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, *1*(2), 220–225.
<http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/2/2/40.pdf>
- Mazloomi, K., & Gomes, C. (2012). Hydrogen as an energy carrier: Prospects and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *16*(5), 3024–3033.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.02.028>

- Méndez-Acosta, H. O., Snell-Castro, R., Alcaraz-González, V., González-Álvarez, V., & Pelayo-Ortiz, C. (2010). Anaerobic treatment of Tequila vinasses in a CSTR-type digester. *Biodegradation*, 21(3), 357–363. <https://doi.org/10.1007/s10532-009-9306-7>
- Milenio (2019). *México sale a conquistar el mundo con su tequila*. Recuperado de: <https://www.milenio.com/negocios/mexico-sale-a-conquistar-el-mundo-con-su-tequila>
- Milenio (2020). *Encierro dispara exportaciones de tequila hacia Estados Unidos*. Recuperado de: <https://www.milenio.com/negocios/financiamiento/encierro-dispara-exportaciones-de-tequila-hacia-estados-unidos>
- Mohd, A. (2020). Presence of phenol in wastewater effluent and its removal: an overview. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 00(00), 1–23. <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1738412>
- Montañez, J. L., Victoria, J. C., Flores, R., & Vivar, M. A. (2011). Fermentación de los fructanos del Agave tequilana Weber Azul por *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de bioetanol. *Información Tecnológica*, 22(6), 3–14. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642011000600002>
- Montiel Corona, V., & Razo-Flores, E. (2018). Continuous hydrogen and methane production from Agave tequilana bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. *Bioresource Technology*, 249(October 2017), 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.032>
- Mu, Y., Zheng, X. J., Yu, H. Q., & Zhu, R. F. (2006). Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(6), 780–785. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2005.06.016>
- Muñoz-Estrada, J. R. (2021). *Producción de hidrógeno y metano y su relación con poblaciones microbianas en un sistema anaerobio seriado a partir de vinazas tequileras crudas*. Tesis de maestría. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.
- Muñoz-Páez, K. M., Alvarado-Michi, E. L., Moreno-Andrade, I., Buitrón, G., & Valdez-Vazquez, I. (2020). Comparison of suspended and granular cell anaerobic bioreactors for hydrogen production from acid agave bagasse hydrolyzates. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(1), 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.10.232>
- Nienow, A. W. (2014). Stirring and stirred-tank reactors. *Chemie-Ingenieur-Technik*, 86(12), 2063–2074. <https://doi.org/10.1002/cite.201400087>
- NMX-AA-029-SCFI-2001 (2001). Norma Mexicana NMX-AA-029-SCFI-2001. *Análisis de aguas – Determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – Método de prueba*.

- NMX-AA-034-SCFI-2015 (2015). Norma Mexicana NMX-AA-034-SCFI-2015. *Análisis de agua – Medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – Método de prueba.*
- NMX-AA-050-SCFI-2001 (2001). Norma Mexicana NMX-AA-050-SCFI-2001. *Análisis de agua – Determinación de fenoles totales en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas – Método de prueba.*
- Nnaji, C. C. (2013). A review of the upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Desalination and Water Treatment*, 52(22–24), 4122–4143.
<https://doi.org/10.1080/19443994.2013.800809>
- Núñez, H., Rodríguez, L., Khanna, M. (2011). Agave for tequila and biofuels: an economic assessment and potential opportunities. *GCB Bioenergy*, 43–57.
<https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2010.01084.x>
- Núñez, R. Á., Pérez, B. R., Hernández, R., Nacional, U., Francisco, E., & Perozos, N. A. L. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease. *Multiciencias*, 12(2), 129–135.
- Ødegaard, H. (2006). Innovations in wastewater treatment: The moving bed biofilm process. *Water Science and Technology*, 53(9), 17–33. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.284>
- Palomo-Briones, R., Montoya-Rosales, J. de J., & Razo-Flores, E. (2021). Advances towards the understanding of microbial communities in dark fermentation of enzymatic hydrolysates: Diversity, structure and hydrogen production performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.06.016>
- Park, J. H., Kim, D. H., Kim, S. H., Yoon, J. J., & Park, H. D. (2018). Effect of substrate concentration on the competition between Clostridium and Lactobacillus during biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(25), 11460–11469. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.08.150>
- Parra Huertas, R. A. (2016). Digestión anaeróbica: mecanismos biotecnológicos en el tratamiento de aguas residuales y su aplicación en la industria alimentaria. *Producción + Limpia*, 10(2), 142–159. <https://doi.org/10.22507/pml.v10n2a13>
- Peña, E., Pérez, A., Ander, M., & Sánchez, J. (2008). Modelado de un reactor químico tipo CSTR y evaluación del control predictivo aplicando Matlab-Simulink. *Ingeniería Uc*, 15, 97–112.
- Peñaranda, L. victoria;, Montenegro, S. patricia;, & Giraldo, P. A. (2017). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(2145–6097), 141–150.
<http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/2040/2293>

- Pérez-Pimienta, JA., López-Ortega, M., Sánchez, A. (2012). Recent developments in Agave performance as a drought-tolerant biofuel feedstock: agronomics, characterization and biorefining. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(3), 246–256. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- Ramalho, R. S. (2003). *Tratamiento de aguas residuales*. (pp. 48). España: Reverté.
- Robles-González, V., Galíndez-Mayer, J., Rinderknecht-Seijas, N., & Poggi-Varaldo, H. M. (2012). Treatment of mezcal vinasses: A review. *Journal of Biotechnology*, 157(4), 524–546. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.09.006>
- Rodríguez-Félix, E., Contreras-Ramos, S. M., Dávila-Vázquez, G., Rodríguez-Campos, J., & Marino-Marmolejo, E. N. (2018). Identification and Quantification of Volatile Compounds Found in Vinasses from Two Different Processes of Tequila Production. *Energies*, 12–15. <https://doi.org/10.3390/en11030490>
- Roldán, G. & Ramírez, J. (2008). *Fundamentos de limnología neotropical. 2ª edición*. (pp. 194). Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Sardiñas Peña, O., & Pérez Cabrera, A. (2004). Determinación de nitrógeno amoniacal y total en aguas de consumo y residuales por el método del fenato. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 42(2).
- Sekoai, P. T., Awosusi, A. A., Yoro, K. O., Singo, M., Oloye, O., Ayeni, A. O., Bodunrin, M., & Daramola, M. O. (2018). Microbial cell immobilization in biohydrogen production: a short overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(2), 157–171. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1312274>
- Severiche Sierra., C. A., Luna Jara, J. Y., & Gonzalez García, H. (2013). Evaluación analítica para la determinación de fósforo total en aguas por el método del ácido ascórbico. *Ingenium*, 7(17), 37. <https://doi.org/10.21774/ing.v7i17.316>
- Song, J., An, D., Ren, N., Zhang, Y., & Chen, Y. (2011). Effects of pH and ORP on microbial ecology and kinetics for hydrogen production in continuously dark fermentation. *Bioresource Technology*, 102(23), 10875–10880. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.024>
- Tomei, M. C., Mosca Angelucci, D., Clagnan, E., & Brusetti, L. (2021). Anaerobic biodegradation of phenol in wastewater treatment: achievements and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(6), 2195–2224. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11182-5>
- TP- Laboratorio Químico (2020). *pHmetro (Medidor de pH)*. Recuperado de: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/phmetro.html>

- United Nations Climate Change (2020). ¿Qué es el Acuerdo de París? Recuperado de: <https://unfccc.int/es/process-and-meetings/the-paris-agreement/que-es-el-acuerdo-de-paris>
- Vacca, V., Rincón, N., Colina, G., Marín, J., Díaz, A., Behling, E., Chacín, E., & Fernández, N. (2008). Tratamiento anaerobio para la remoción de compuestos fenólicos e hidrocarburos saturados. *Revista Técnica de La Facultad de Ingeniería Universidad Del Zulia*, 31(3), 225–233.
- Vargas-Corredor, Y.; Pérez-Pérez, L. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 14(1), 1–14.
- Villanueva-Rodríguez, S.J., Rodríguez Garay, B., Prado-Ramírez, R., Gschaedler, A. (2016). Tequila: Raw Material, Classification, Process and Quality Parameters. *Encyclopedia of Food and Health*, 1, 283–289. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00688-7>
- Volpini, V., Lovato, G., Albanez, R., Ratusznei, S. M., & Rodrigues, J. A. D. (2018). Biomethane generation in an AnSBBR treating effluent from the biohydrogen production from vinasse: Optimization, metabolic pathways modeling and scale-up estimation. *Renewable Energy*, 116, 288–298. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.09.004>
- Zhang, Q., Chen, Z., Zhu, Y., & Xie, H. (2012). COD removal of washing water by photodegradation. *Advanced Materials Research*, 549, 415–418. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.549.415>

12. ANEXOS

12.1. Técnicas de caracterización fisicoquímica

12.1.1. Demanda Química de Oxígeno

Parámetro utilizado para la determinación del grado de contaminación presente en muestras de agua y de agua residual respecto al contenido de materia orgánica susceptible de ser oxidada (CO₂ y agua) por un agente químico bajo condiciones ácidas (Roldán & Ramírez, 2008).

12.1.1.1. Materiales, reactivos y equipo

- Digestor HACH DRB200
- Espectrofotómetro HACH DRB2800
- Viales para digestión de DQO HACH rango alto plus (250 – 15,000 mg/L)

12.1.1.2. Procedimiento

Antes de comenzar a preparar las muestras, es necesario encender el digestor y precalentarlo a 150 °C.

La muestra debe ser homogeneizada y diluida en una proporción adecuada para que el resultado se encuentre dentro del rango de lectura que permita el kit utilizado. El vial correspondiente al blanco, se prepara añadiendo 200 µl de agua destilada por las paredes y el procedimiento se repite para cada una de las muestras a analizar. Se cierran correctamente las tapas de cada vial para poder invertirlos y se mezclan suavemente antes de introducirlos al digestor, en donde se lleva a cabo la reacción a 150 °C durante 2 horas.

Transcurrido el tiempo pertinente, se apaga el digestor y se deja enfriar durante unos minutos hasta 120 °C. Posteriormente, se retiran los viales, se homogeneizan y apartan en una gradilla hasta que su temperatura sea igual a la del ambiente.

En el espectrofotómetro, se debe cargar el programa DQO RA 435 antes de comenzar las lecturas de las muestras. El cero se ajusta con el blanco.

12.1.2. pH

Es una medida que indica el nivel de acidez o alcalinidad respecto a la concentración de iones de hidrógeno que posee determinada disolución. El rango de la escala de pH se encuentra entre 0 y 14, donde 7 es considerado un valor neutro; mientras que los números menores a éste hacen alusión a un líquido de carácter ácido, los superiores corresponden a uno alcalino (Jiménez, 2001).

Para conocer el valor de este parámetro, se utiliza un electrodo de vidrio que, al entrar en contacto con la disolución, genera un potencial electroquímico y envía una señal al amplificador electrónico, el cual la convierte a un dato cuantitativo equivalente a unidades de pH (TP- Laboratorio Químico, 2020).

12.1.3. Determinación de Azúcares Totales

El método fenol-sulfúrico permite la determinación de azúcares y sus derivados de metilo, oligosacáridos y polisacáridos, mediante una reacción colorimétrica cuantitativa (Dubois et al., 1956).

12.1.3.1. Materiales, reactivos y equipo

- Glucosa ($C_6H_{12}O_6$)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4)
- Fenol 5% (C_6H_5OH)
- Viales de cristal con tapa (viales HACH)
- Espectrofotómetro HACH DRB2800

12.1.3.2. Procedimiento

En primera instancia, es necesario preparar una solución al 5% P/V de fenol, la cual se deberá conservar a 4 °C hasta su utilización.

La curva patrón se realiza empleando glucosa considerando un rango entre 20 y 100 mg/L, de tal manera que los puntos sean equidistantes entre sí. La muestra a analizar se debe diluir en una relación apropiada a fin de que el resultado del contenido de azúcares totales presentes en la misma se encuentre dentro del rango estimado. Cada uno se realiza por triplicado.

A cada vial se le añade 1 mL de muestra y el blanco se prepara con agua destilada. Posteriormente, en una campana de extracción, se agregan 600 µl de fenol 5% y 3.5 mL de H₂SO₄, lentamente y vertiendo por las paredes del vial. Cada uno se cierra correctamente para evitar derrames y se mezcla el contenido de forma delicada un par de veces favoreciendo que se produzca la reacción colorimétrica correspondiente, pero manteniendo las precauciones adecuadas ya que se trata de una reacción exotérmica.

Para poder realizar las lecturas de las absorbancias en el espectrofotómetro, los viales se dejan reposar durante unos minutos hasta que se enfríen y alcancen la temperatura ambiente. Se emplea una longitud de onda de 480 nm, ajustando a cero con el blanco.

12.1.4. Azúcares reductores

Se caracterizan por poseer un grupo cetona (-CO-) o aldehído (-CHO) libre que les permite ceder electrones a otras moléculas (AA.VV., 2003). En el método Miller, al entrar en contacto con el DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) en presencia de calor, se produce una reacción colorimétrica mediante la cual es posible observar una gama de coloración cuyas variaciones van desde el amarillo hasta el café, las cuales corresponden a la concentración que tienen este tipo de azúcares en la muestra (Núñez et al., 2012).

12.1.4.1. Materiales, reactivos y equipo

- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (C₇H₄N₂O₇)
- Glucosa (C₆H₁₂O₆)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Tartrato mixto de sodio y potasio (KNaC₄H₄O₆)
- Viales de cristal con tapa (viales HACH)
- Vortex
- Digestor HACH DRB200
- Espectrofotómetro HACH DRB2800

12.1.4.2. Procedimiento

El reactivo DNS 1% se prepara mezclando dos soluciones: A (se disuelve 1.6 g de NaOH + 30 g de tartrato de sodio y potasio en 50 mL de agua destilada) y B (se diluye 1 g del reactivo DNS en 30 mL de agua destilada). La relación resultante de dicha mezcla se afora a 100 mL y la solución se almacena en un frasco ámbar.

Para la curva patrón (250 – 1500 mg/L), se utiliza glucosa como estándar. En el caso de las muestras, es necesario llevar a cabo una dilución adecuada para que el contenido de azúcares reductores presente encaje dentro del rango considerado.

Se adicionan 0.5 mL de muestra y 0.5 mL de reactivo DNS al 1% a cada vial, mismo que debe tener sus réplicas correspondientes de tal modo que la prueba individual se realice por triplicado, tanto para los puntos de concentración como para las muestras a analizar. El blanco se prepara con agua destilada.

Antes de introducir al digestor (100 °C / 5 min), se cierran los viales para poder mezclar levemente el contenido empleando el vortex. Transcurrido el tiempo indicado, se retiran los viales y se agregan 5 mL de agua destilada a cada uno. Nuevamente con ayuda del vortex, se agita cada vial hasta homogeneizar y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Las lecturas en el espectrofotómetro se realizan a 540 nm y el blanco se utiliza para ajustar a cero.

12.1.5. Fenoles totales por 4- aminoantipirina

Al contar con un anillo aromático, los fenoles son considerados derivados del benceno. Asimismo, se distinguen por contar con uno o más grupos hidroxilo (Mahabubur & Md., 2012).

El método utilizado se desarrolla bajo condiciones alcalinas ($\text{pH} = 7.9 \pm 0.1$) y se basa en la reacción que se produce entre los fenoles y el reactivo 4- aminoantipirina en presencia de ferrocianuro de potasio. De esta manera, se forman compuestos cuya coloración varía de amarillo intenso a rojo, misma que corresponde con la concentración existente de los fenoles en la muestra (NMX-AA-050-SCFI-2001).

12.1.5.1. Materiales, reactivos y equipo

- 4- aminoantipirina ($C_{11}H_{13}N_3O$)
- Ferrocianuro de potasio ($K_4Fe(CN)_6$)
- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)
- Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4).
- Hidróxido de amonio (NH_4OH)
- Hidróxido de potasio (KOH)
- Ácido fosfórico (H_3PO_4)
- Ácido gálico ($C_7H_6O_5$)

12.1.5.2. Procedimiento

Durante el ensayo, se requiere de cuatro soluciones que deben ser preparadas con anticipación para poder iniciar con el desarrollo de la metodología. Cada una se debe almacenar en un frasco ámbar hasta su uso:

- Solución A: 0.5 N NH_4OH .
Medir 35 mL del reactivo y aforar con agua destilada a 1 L.
- Solución B: buffer de fosfatos.
Pesar 52.25 g de K_2HPO_4 y 36.15 g de KH_2PO_4 . Mezclar ambos reactivos y aforar a 500 mL con agua destilada. El pH se ajusta a 6.8 con KOH o H_3PO_4 .
- Solución C: disolver 1 g de aminoantipirina en agua destilada y aforar hasta alcanzar un volumen de 50 mL. En este caso, es importante considerar que la vigencia de almacenamiento solamente es de 4 semanas.
- Solución D: disolver 4 g de $K_4Fe(CN)_6$ en agua destilada y aforar a 50 mL.

Este método posee una alta sensibilidad, por lo que la muestra debe ser diluida de modo que el resultado obtenido se encuentre dentro del rango establecido en la curva patrón, la cual se prepara con ácido gálico en intervalos equidistantes de 1 a 20 mg/L. Tanto los puntos de concentración de la curva de calibración como las muestras a analizar deben contar con sus respectivas réplicas para que la prueba se realice por triplicado y así se obtenga un resultado confiable y seguro. El blanco se prepara con agua destilada.

El volumen final de cada vial, considerando únicamente la muestra, es de 10 mL. Una vez añadido, se agregan 250 µL de solución A, 330 µL de solución B (cantidad sujeta a cualquier tipo de variación ya que actúa como regulador de pH, cuyo valor debe ser de 7.9 ± 0.1), 100 µL de solución C y 100 µL de solución D. Es importante homogeneizar la muestra con cada uno de los reactivos antes de agregar el siguiente.

Las muestras deben procesarse una por una. Al agregar el último reactivo, es necesario evitar la presencia de luz debido a la fotosensibilidad del método. Se recomienda no procesar más de 10 muestras a la vez ya que, después de adicionar la solución D a cada vial, el tiempo de espera para poder realizar la lectura en el espectrofotómetro es de 15 minutos. Se emplea una longitud de onda de 460 nm y el cero es ajustado con el blanco.

12.1.6. Nitrógeno Total

El nitrógeno es un elemento químico que forma parte de la composición de la materia orgánica presente en la carga contaminante de aguas residuales. La determinación de este indicador consiste en la medición tanto del nitrógeno amoniacal como del nitrógeno orgánico (nitrato, nitrito y amonio) que contiene la muestra (Sardiñas Peña & Pérez Cabrera, 2004).

12.1.6.1. Materiales, reactivos y equipo

- Kit HACH TNT 828 para nitrógeno total (método de digestión de persulfato) rango ultra alto (20 – 100 mg/L)
- Viales de cristal con tapa, limpios
- Digestor HACH DRB200
- Espectrofotómetro HACH DRB2800

12.1.6.2. Procedimiento

En un vial limpio, se colocan 200 µL de muestra, se añaden 2.3 mL de solución A y se introduce una pastilla de B (ambas incluidas en el kit). El análisis se realiza por triplicado. Si es necesario, se lleva a cabo una dilución de la muestra para que el resultado de la concentración pueda ser detectado por el equipo.

Posteriormente, los viales son trasladados al digestor, el cual se programa para que permanezcan ahí a 100 °C durante una hora, asegurándose de que estén cerrados correctamente. Al cumplirse el tiempo establecido, se retiran del equipo y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Se añade una pastilla del reactivo C y, cuando se haya disuelto completamente en el contenido del vial, se transfieren 500 µl de la muestra preparada a uno de los viales incluidos en el kit y se agregan 200 µl de solución D. Tras añadir los últimos dos reactivos, es importante cerrar el vial e invertirlo con el fin de propiciar la homogeneidad de la mezcla.

Quince minutos después de haber agregado la última solución, los viales se insertan en el espectrofotómetro, en donde se selecciona el programa ya precargado para la determinación del contenido de nitrógeno total en la muestra. El resultado se obtiene mediante la lectura del código de barras que se encuentra en el vial; por esta razón, no es necesario el uso de un blanco.

12.1.7. Fósforo Total

En aguas naturales, residuales y residuales tratadas, el fósforo se encuentra en forma de fosfatos que, a su vez, se clasifican en ortofosfatos, fosfatos condensados (piro, meta y otros polifosfatos) y fosfatos enlazados orgánicamente. Su estructura química se distingue por la presencia de cuatro átomos de oxígeno (tres de ellos con carga negativa) que rodean a un átomo de fósforo (Hanna Instruments, 2019; Severiche Sierra et al., 2013).

La descarga de fosfatos en cuerpos de agua puede estimular el crecimiento de macro y microorganismos en abundantes cantidades debido a la esencialidad del fósforo como nutriente para su desarrollo. Por ello, la medición de este parámetro brinda una aproximación de la actividad biológica (NMX-AA-029-SCFI-2001).

12.1.7.1. Materiales, reactivos y equipo

- Kit HACH TNT 845 para fósforo total (método del ácido ascórbico) rango ultra alto (6 – 60 mg/L)
- Digestor HACH DRB200
- Espectrofotómetro HACH DRB2800

12.1.7.2. Procedimiento

Antes de verter la muestra dentro del vial, cuidadosamente, se aparta la cobertura de aluminio que se encuentra sobre la tapa, de tal modo que ésta pueda ser retirada. Al estar descubierta la boquilla del vial, se añaden 500 µl de muestra y el vial se cierra invirtiendo la tapa, cerciorándose de que quede con las estrías hacia arriba. Es recomendable agitar durante 3 segundos hasta garantizar que el reactivo se desprenda totalmente de la tapa. La prueba se realiza por triplicado.

Una vez preparados todos los viales a analizar, se introducen en el digestor y se mantienen ahí a una temperatura de 100 °C durante una hora. Al cabo de ese tiempo, se retiran del equipo, se dejan enfriar y, cada uno, se agita durante 3 segundos. Posteriormente, se agregan 200 µl del reactivo B, el cual se debe cerrar inmediatamente después de ser utilizado.

Para asegurarse que el reactivo se haya disuelto en su totalidad, se invierten los viales dos o tres veces, se dejan reposar por diez minutos y se vuelven a agitar. El método ya está precargado en el espectrofotómetro, únicamente se introducen los viales para realizar las lecturas correspondientes. El uso de un blanco no se hace necesario.

12.1.8. Carbono Orgánico Total (COT)

Mediante la determinación de este parámetro es posible conocer la concentración de la materia orgánica disuelta y suspendida presente en la muestra de agua residual (Baird, 2001).

El principio de operación fundamental de los analizadores de Carbono Orgánico Total se basa en la combustión de la materia orgánica, dando como resultado la obtención de dióxido de carbono y agua. Estos equipos, además, proporcionan la cuantificación de manera separada de carbono total (carbono de materias orgánicas) y carbono inorgánico, que incluye carbonatos (CO_3^{2-}), bicarbonatos (HCO_3^-) y CO_2 disuelto en la muestra (Ramalho, 2003).

12.1.9. Sólidos Totales (ST)

Representa la concentración total de las sustancias disueltas en el agua, las cuales afectan de manera negativa la calidad de la misma (NMX-AA-034-SCFI-2015).

12.1.9.1. Materiales y equipo

- Cisoles de porcelana
- Estufa
- Desecador
- Pinzas para crisoles
- Guantes de carnaza
- Balanza analítica

12.1.9.2. Procedimiento

Los crisoles son llevados a peso constante manteniéndolos en la estufa a 100 °C durante 24 h. Es sumamente importante evitar su manipulación sin las pinzas ya que existe el riesgo de ocasionar algún accidente debido a la alta temperatura en la que se encuentran dentro del horno o, bien, se puede modificar el peso del crisol al entrar en contacto con las partículas que se adhieren a las manos del operador.

Sobre el crisol, se vierten 200 µl de la muestra, la cual debe estar a temperatura ambiente y ser previamente homogeneizada. Para secarla, el crisol se traslada a una estufa cuya temperatura sea de 105 °C y se mantiene ahí durante una hora. Se enfría utilizando el desecador, el tiempo de permanencia en el mismo será hasta que su temperatura sea igual a la del ambiente. Después, se registra el peso del crisol con la muestra y se utiliza la fórmula descrita en la **Ecuación 8** para calcular la concentración de Sólidos Totales.

$$ST = \frac{(A - B) * 1000}{\text{Volumen de muestra (ml)}}$$

Donde:

A = Peso del crisol con residuo (mg)

B = Peso del crisol (mg)

Ecuación 8. *Fórmula para calcular la concentración de Sólidos Totales*

12.1.10. Sólidos Totales Volátiles (STV)

Corresponde a la cantidad de materia tanto orgánica como inorgánica que es capaz de volatilizarse por efecto de la calcinación a 550 °C (NMX-AA-034-SCFI-2015).

12.1.10.1. Materiales y equipo

- Crisoles de porcelana
- Desecador
- Estufa
- Mufla
- Guantes de carnaza
- Pinzas para crisol
- Balanza analítica

12.1.10.2. Procedimiento

En un crisol que, previamente, haya sido llevado a peso constante, se vacían 2 mL de muestra, misma que es sometida a un proceso de secado en la estufa (105 °C / 60 minutos). Tras permanecer en el desecador el tiempo suficiente para que se enfríe, se utiliza la balanza para pesarlo y se registra el dato obtenido.

En este caso, es necesario calcinar la muestra, por lo que el crisol se introduce en la mufla y se mantiene ahí a 550 °C por un tiempo de quince a veinte minutos. Después del tiempo fijado, se apaga la mufla y se sugiere no abrir hasta que la temperatura haya descendido a 100 °C; de esta manera, se favorece la manipulación del crisol al transferirlo al desecador. El registro del peso del crisol con la muestra calcinada se utiliza para calcular la concentración de Sólidos Totales Volátiles utilizando la fórmula de la **Ecuación 9**.

$$STV = \frac{(C - D) * 1000}{\text{Volumen de muestra (ml)}}$$

Donde:

C = Peso del crisol respecto a ST (mg)

D = Peso del crisol con la muestra calcinada (mg)

Ecuación 9. *Fórmula para calcular la concentración de Sólidos Totales Volátiles*

12.2. Curvas de calibración utilizadas para la caracterización de vinaza

12.2.1. Curvas de calibración para azúcares totales

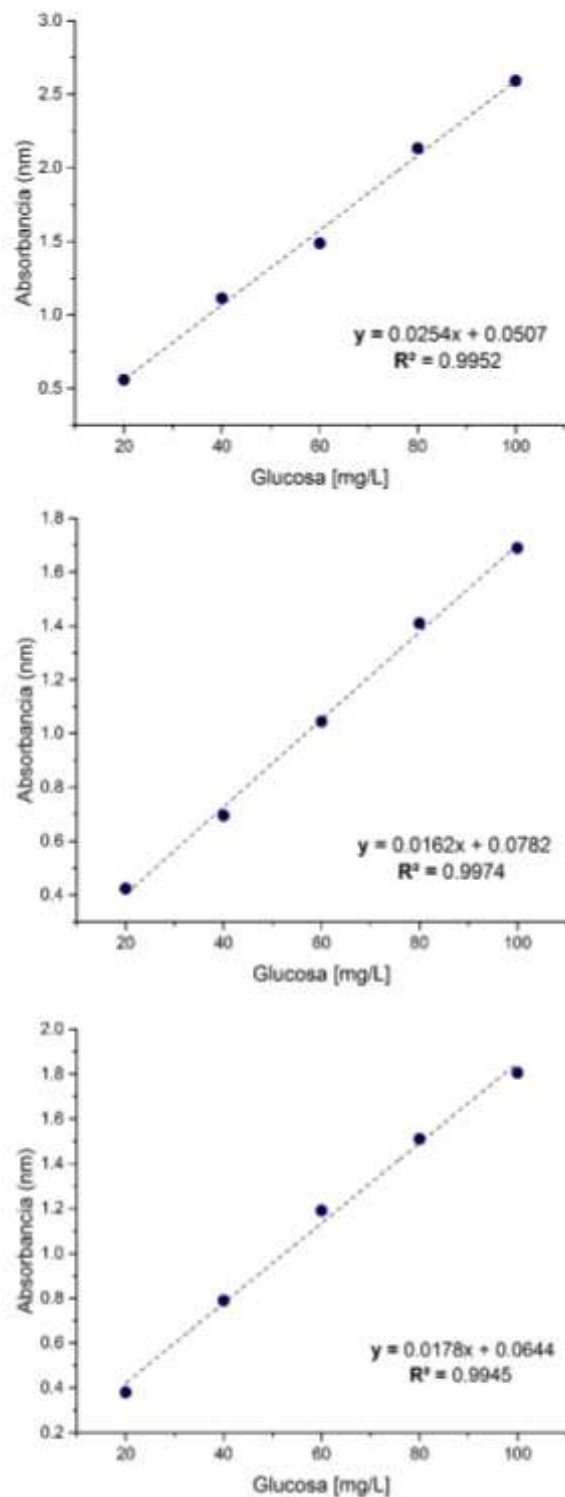


Figura 33. Curvas de calibración para glucosa. Determinación de azúcares totales para caracterización de vinaza

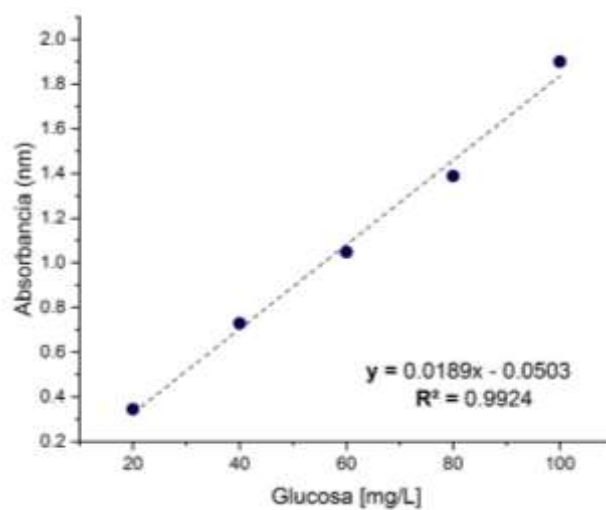
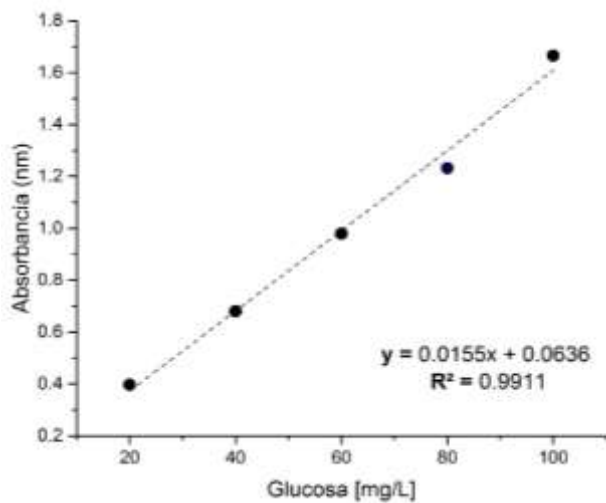
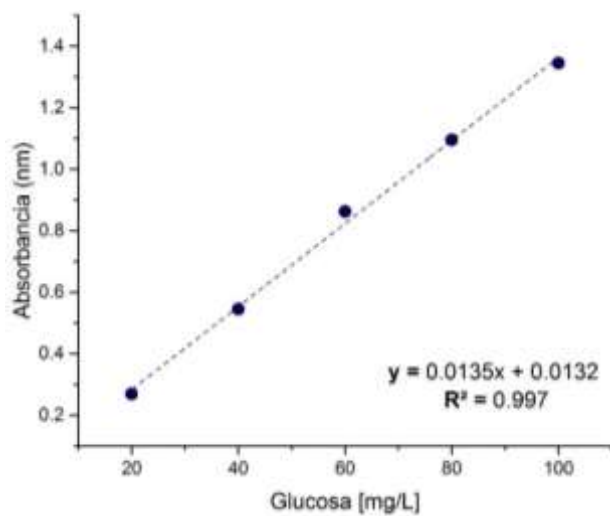


Figura 34. Curvas de calibración para glucosa. Determinación de azúcares totales para caracterización de vinaza (continuación)

12.2.2. Curvas de calibración para azúcares reductores

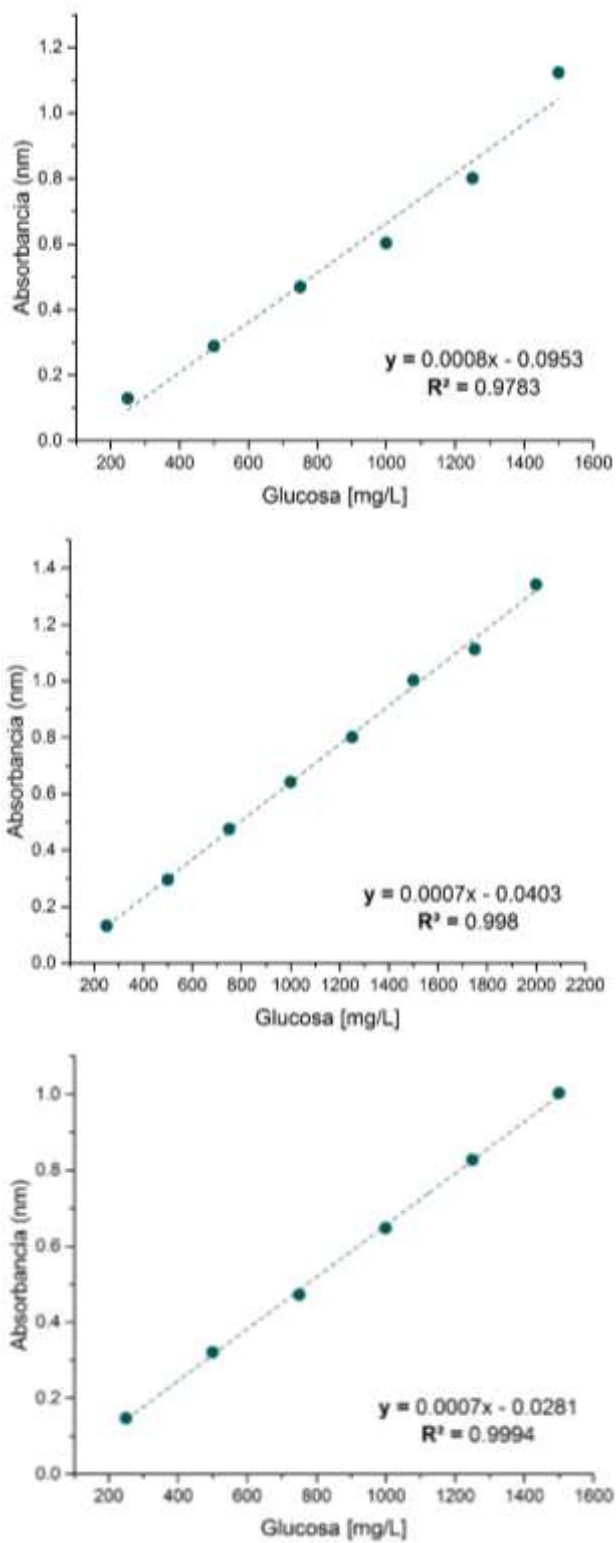


Figura 35. Curvas de calibración para glucosa. Determinación de azúcares reductores para caracterización de vinaza

12.2.3. Curvas de calibración para fenoles totales

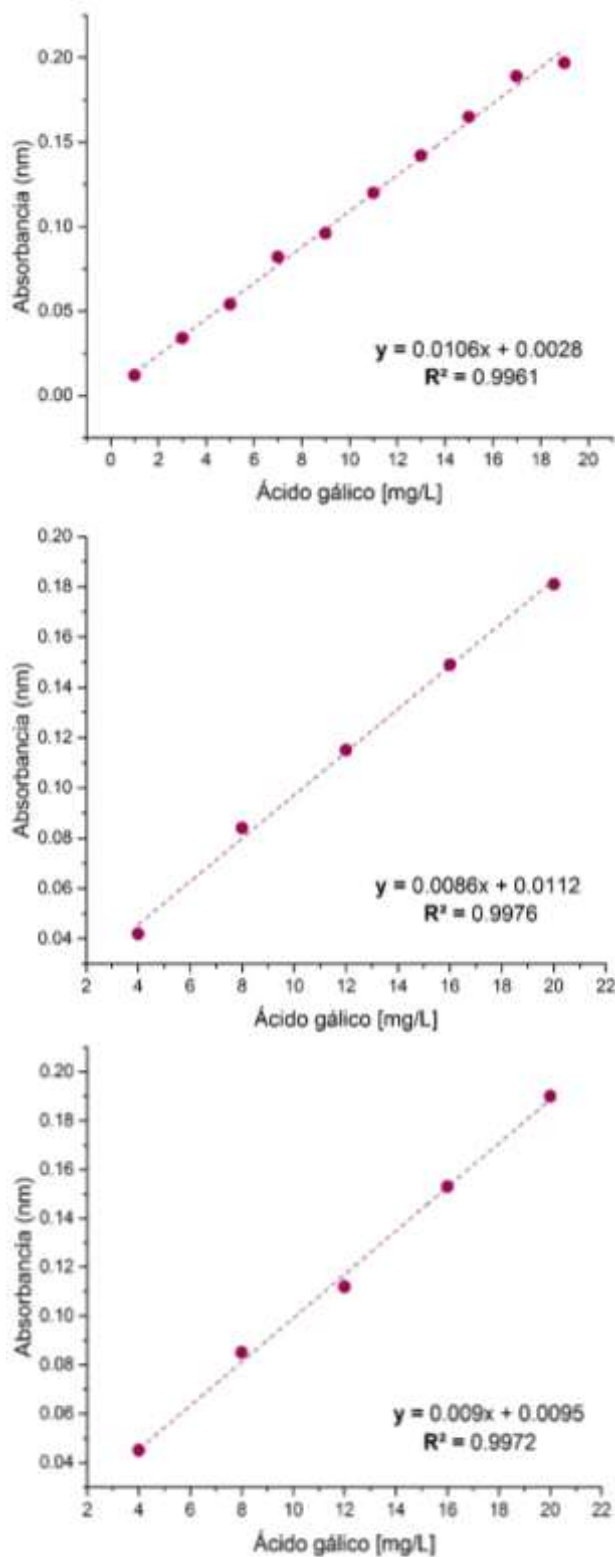


Figura 36. Curvas de calibración para ácido gálico. Determinación de fenoles totales para caracterización de vinaza

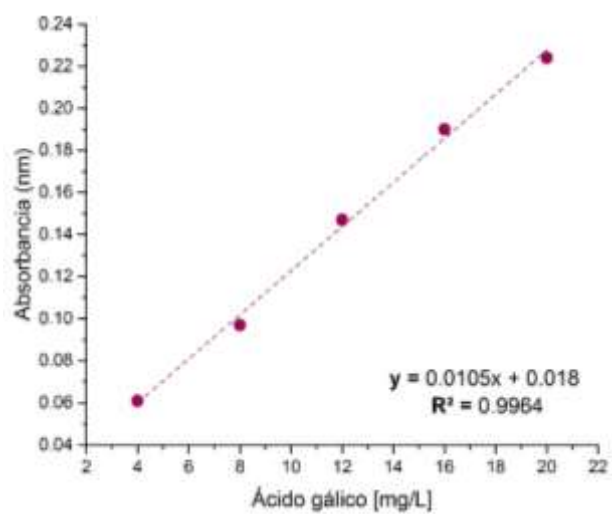


Figura 37. Curva de calibración para ácido gálico. Determinación de fenoles totales para caracterización de vinaza (continuación)