



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

**EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS
OPERACIONALES PARA LA PRODUCCIÓN DE
HIDRÓGENO A PARTIR DE
LA BIODEGRADACIÓN DE VINAZAS**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERÍA

INGENIERÍA AMBIENTAL

P R E S E N T A :

JUAN ALFREDO MONTES MONCIVAIS

DIRECTOR DE TESIS: DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ



MÉXICO, D.F.

2008

JURADO ASIGNADO:

Presidente: DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZÁLEZ

Secretario: DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ

Vocal: DR. VÍCTOR ÁLCARAZ GONZÁLEZ

1^{er.} Suplente: DR. HÉCTOR POGGI VARALDO

2^{do.} Suplente: DRA. GABRIELA MOELLER CHÁVEZ

Lugar donde se realizó la tesis:

INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM.

TUTOR DE TESIS:

DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ

Tlalticpac Toquichtin Tiez
La tierra será como sean los hombres

Para Dios, por su puesto, *por el cual clamo ¡ABBA! Padre,*
ya que todo lo que hago es por Él y para Él.

Para mis padres, Juan y Paz
Gracias por ser mis mejores amigos incondicionales

Para mis hermanos Guadalupe y Tadeo
Gracias por siempre creer en mí

Para mis grandes amigos
Altamira Boy's (& Girl's); ITCM; Getsemaní; Huehues;
Vinicubos; Pumas; DFños, Keretaros; Zorros.
*Que me apoyaron en la distancia y en los momentos
tanto gratos como difíciles.*

Juan Alfredo

Yahvé Eloim, Yahvé Nisi

Agradecimientos

A la Coordinación de Bioprocesos Ambientales del Instituto de Ingeniería de la UNAM, hoy Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados para el Tratamiento de Aguas, por el apoyo brindado a la realización del presente trabajo.

Al Dr. Germán Buitrón Méndez, por permitirme integrarme a su grupo de trabajo, por su guía, enseñanzas y apoyo que siempre me ha brindado.

Al Dr. Gustavo Viniegra Gonzalez y a la Dra. Gabriela Moeller Chávez, miembros del comité tutorial por su asesoría y valiosas aportaciones para mejorar este trabajo.

Gracias a los miembros del jurado Dr. Héctor Poggi Varaldo, Dr. Victor Alcaraz González, Dr. Gustavo Viniegra Gonzalez, Dra. Gabriela Moeller Chávez y Dr. Germán Buitrón Méndez, por sus valiosas aportaciones a esta tesis.

A mis compañeros del grupo de investigación: Dafne Gonzalez, Francisco Velarde, Rodrigo Cervantes, Wilverth Villatoro, Mónica, Carolina Carvajal, Juan Luis Sandoval, Dorian Prato, Francisco Torner, por haberme brindado su amistad y apoyo.

A Diana Marcelina Molina V., Gastón Martínez de J., Jaime Gonzalez M., Nancy Ramirez H., Rosangela Zaragoza; por la amistad brindada, el apoyo y soporte durante la realización de la maestría.

A Gloria Moreno Rodríguez por el apoyo técnico durante el trabajo de investigación y principalmente por su amistad.

A Jaime Perez Trevilla por su ayuda dentro y fuera del laboratorio, ahora si que es todo un "McGiver", gracias Jaime.

A CONACYT por la beca otorgada para la realización de este trabajo, sin ella difícilmente lo hubiera llevado a cabo.

A mi familia por siempre motivarme y apoyarme a seguir en este proyecto. La meta cumplida es de ellos.

Finalmente agradezco a Dios por la oportunidad de desarrollarme profesionalmente, Él sabe que es para su Obra.

Índice

Página

ABREVIATURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
RESUMEN	6
ABSTRAC	7
Capítulo 1 Introducción	8
1.1 Procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales	9
1.2 Metabolismo anaerobio	9
1.2.1 Acidogénesis	10
1.2.2 Acetogénesis	11
1.2.3 <i>Clostridium</i>	11
1.3 Producción de hidrógeno	12
1.3.1 Generación química	13
1.3.2 Generación electrolítica	14
1.3.3 Producción biológica	15
1.4 Generación de hidrógeno vía fermentación	15
1.5 Producción de acetona, butanol y etanol por bacterias <i>Clostridium</i> : una limitante en la producción de hidrógeno.	17
1.5.1 Fermentación acetonabutílica	17
1.5.2 Descripción del proceso	18
1.6 Reactor discontinuo secuencial (SBR)	19
1.7 Vinazas ¡Error! Marcador no definido.	
Capítulo 2 Antecedentes	22
2.1 Producción biológica de hidrógeno	22
2.2 Factores que afectan las pruebas de producción biológica de hidrógeno	24
2.3 Reactor productor de hidrógeno	25
Capítulo 3 Hipótesis y Objetivos	27
3.1 Hipótesis	27
3.2 Objetivo general	27
3.3 Objetivos particulares	27
Capítulo 4 Metodología General	28
4.1 Plan experimental	28
4.2 Pretratamiento del inóculo	29
4.2.1 Determinación de esporas (Wirtz-Conklin)	29
4.3 Prueba de producción biológica de hidrógeno	30
4.3.1 Medición de biogás	31
4.4 Reactor	32
4.5 Técnicas analíticas	33
4.5.1 Hidrógeno, dióxido de carbono y metano	33
4.5.2 Ácidos Grasos Volátiles (AGV) y Solventes (Etanol y Acetona)	33
4.5.3 Demanda Química de Oxígeno (DQO)	34

4.5.4	Carbono Orgánico Total	34
4.5.5	Demanda Biológica de Oxígeno (DBO ₅)	34
4.5.6	Caracterización de los inóculos	35
4.5.7	Nitrógeno amoniacal (N-NH ₃) (Método Hach 8038)	36
4.5.8	Fenoles	36
4.5.9	Sulfatos (Método Hach 8051)	36
Capítulo 5 Pruebas de producción biológica de hidrógeno: Selección del inóculo, pH y temperatura óptimos		37
5.1	Introducción	37
5.2	Metodología	38
5.2.1	Influencia del origen del inóculo	38
5.2.2	Influencia del pH y temperatura	39
5.3	Resultados y discusión	39
5.3.1	Caracterización de los inóculos	39
5.3.2	Influencia del origen del inóculo en la producción de hidrógeno	40
5.3.3	Influencia del pH y la temperatura en la producción de hidrógeno	43
5.4	Conclusiones	45
Capítulo 6 Evaluación del potencial de vinazas de la industria del tequila y de un ingenio azucarero para la producción de hidrógeno.		47
6.1	Introducción	47
6.2	Metodología	48
6.2.1	Caracterización de las vinazas	48
6.2.2	Evaluación del potencial de producción de hidrógeno	48
6.3	Resultados y discusión	49
6.3.1	Caracterización de las vinazas	49
6.3.2	Evaluación del potencial de producción de hidrógeno	49
6.4	Conclusiones	50
Capítulo 7 Determinación la carga orgánica y del TRH adecuados para la producción de hidrógeno a partir de la biodegradación de vinazas de la industria del tequila		51
7.1	Introducción	51
7.2	Metodología	52
7.2.1	Influencia de la carga orgánica sobre la producción de hidrógeno	52
7.2.2	Determinación del TRH en un sistema piloto de laboratorio	53
7.3	Resultados y discusión	53
7.3.1	Influencia de la carga orgánica (Bv) sobre la producción de hidrógeno	53
7.3.2	Determinación del TRH en un sistema piloto de laboratorio	54
7.4	Conclusiones	54
Capítulo 8 Resumen de Resultados y Conclusión		55
Capítulo 9 Referencias		57
Anexo1 Publicaciones		60

ABREVIATURAS

ABE	Acetona-Butanol-Etanol
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
AGV	Ácidos grasos volátiles
ATP	Adenosín trifosfato
COM	Composta
COT	Carbono orgánico total
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DQO	Demanda química de oxígeno
EV	Estiércol de vaca
FID	Detector de ionización a la flama
LA	Lodo activado
LG	Lodo granular
MES	2-(N-morpholino) ácido monohidratado etanosulfónico
MS	fenil metil siloxano
NAD	nicotinamida adenín dinucleótido
NADH₂	nicotinamida adenín dinucleótido reducido
r.p.m.	Revoluciones por minuto
PTAR	Planta de tratamiento de aguas residuales
SBR	Reactor discontinuo secuencial
S₀	Sustrato inicial
SSF	Sólidos suspendidos fijos
SST	Sólidos suspendidos totales
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
TL₁₀	Tiempo de latencia
TCD	Detector de conductividad térmica
UASB	Reactor anaerobio de flujo ascendente
V	Volumen del reactor
V_T	Volumen de trabajo
X₀	Microorganismos o biomasa inicial

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1.1	Bacterias del genero Clostridium que participan en las fermentaciones	12
Tabla 1.2	Principales reacciones durante la fermentación de la glucosa	16
Tabla 7.1	Diferentes estudios realizados para producir hidrógeno	23
Tabla 7.2	Características de los diferentes sistemas utilizados para producir hidrógeno a nivel laboratorio	25
Tabla 5.1	Caracterización de los inóculos	40
Tabla 5.2	Producción de biogás de dos inóculos con y sin condiciones de burbujeo con nitrógeno.	43
Tabla 5.3	Productos del metabolismo de las pruebas de producción de hidrógeno a diferentes condiciones de pH y temperatura.	45
Tabla 6.1	Parámetros importantes de las vinazas tequileras y del ingenio azucarero.	49
Tabla 7.1	Productos del metabolismo en el reactor SBR anaerobio para la determinación de la carga orgánica óptima para producir H ₂ .	53
Tabla 7.2	Productos del metabolismo en el reactor SBR anaerobio para la determinación del TRH óptimo para producir H ₂	54

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1	Proceso de transformación de la materia orgánica en un proceso de digestión anaerobia. 10
Figura 1.2	Principales formas de generación de hidrógeno. 13
Figura 1.3	Fermentación de la glucosa por bacterias del género Clostridium (Modificado de Madigan, 2004) 16
Figura 1.4	Producción de hidrógeno molecular y acetato a partir de piruvato (Madigan, 2004) 16
Figura 1.5	Producción de acetona, butanol y etanol durante la fermentación por especies Clostridium 18
Figura 1.6	Fases típicas de un SBR 20
Figura 4.1	Diagrama del plan experimental 29
Figura 4.2	Diagrama general de la prueba de producción biológica de hidrógeno. 31
Figura 4.3	Diagrama del sistema automatizado de medición de biogás desarrollado en el instituto de ingeniería de la UNAM. 32
Figura 4.4	Reactor anaerobio SBR 33
Figura 5.1	Metodología general para determinar la influencia del origen del inóculo, el pH y la temperatura sobre la prueba de producción biológica de hidrógeno. 39
Figura 5.2	Visualización de las esporas formadas a partir del LG durante el pretratamiento 41
Figura 5.3	Producción de hidrogeno con diferentes inóculos; (A) Lodo Granular \triangle ; Lodo Activado \square ; (B) Estiércol de vaca \blacktriangle ; Composta \blacksquare . 42
Figura 5.4	Producción de hidrógeno en función del pH y de la temperatura. 44
Figura 5.5	Influencia de la temperatura sobre la producción de hidrógeno a pH 6.5 44
Figura 6.1	Metodología general para determinar el potencial de las vinazas para producir hidrógeno. 48
Figura 6.2	Resultado de la prueba de producción biológica de hidrógeno a partir de vinazas tequileras y del ingenio azucarero 50
Figura 7.1	Metodología general para determinar la influencia de la carga orgánica y el TRH sobre la producción de hidrógeno en un sistema piloto 52

RESUMEN

El propósito de esta tesis es definir las mejores condiciones para la producción de hidrógeno a partir del tratamiento de las vinazas de las destilerías de tequila. Para ello, se evaluaron los siguientes parámetros operacionales en reactores de laboratorio: el pH, temperatura, la carga orgánica y el TRH, además de determinar la influencia del origen del inóculo sobre el proceso. Se realizaron pruebas por lote en reactores de 300 mL usando cuatro diferentes inóculos: Lodo activado de la planta de tratamiento de aguas residual de CU (UNAM), lodo granular anaerobio de un UASB de la industria cervecera, estiércol de vaca y composta a base de hojarasca. En ellos se evaluó la influencia del origen del inóculo sobre la producción de hidrógeno utilizando glucosa como un sustrato de fácil degradación. Con el inóculo que mostró una mayor producción de hidrógeno, se realizó un experimento con un diseño tipo 3^3 para determinar el pH y la temperatura óptimos para el proceso, usando tres temperaturas (26, 35 y 55°C) y para cada una de estas condiciones tres diferentes pH (4.5, 5.5 y 6.5). El mayor índice de producción de hidrógeno se obtuvo con lodo granular anaerobio a una temperatura de 26 °C y para un rango de pH entre 5.5 y 6.5. Utilizando estas condiciones e inóculo, se escaló el proceso a un sistema piloto en lote de 3 L de volumen de intercambio. Se encontró que el tiempo de retención hidráulica y la carga orgánica óptimos para el proceso fueron de 18 h y 0.75 g DQO/(L*día), respectivamente.

Los resultados de este trabajo permiten establecer las bases para desarrollar estrategias de control óptimo para la producción biológica de hidrógeno en reactores anaerobios discontinuos secuenciales; aunado a esto, el trabajo realizado sugiere la necesidad de normalizar los parámetros operacionales de las pruebas de producción biológica de hidrógeno con el fin de poder hacer comparaciones con otros experimentos de la misma índole.

ABSTRAC

The intention of this study is to define the best conditions for the hydrogen production from the treatment of Tequila's vinasses. For it, the following operational parameters in laboratory reactors were evaluated: pH, temperature, the organic load and the HRT, in addition to determine the influence of the inocula source on the process. Experiments in batch were realised in reactors of 300 mL using four different inocula: Activated sludge from of the wastewater treatment plant (UNAM), anaerobic granular sludge from a UASB of the brewery industry, cow manure and compost from leaves and foliage. Was evaluated them the influence of the inocula source on the hydrogen production using glucose as a substrate easily degraded. With the inoculum that it showed a greater hydrogen production, was realised an experiment with a design type 3^3 to determine the optimal pH and the temperature for the process, using three temperatures (26, 35 and 55°C) and for each of these conditions three different pH (4,5, 5,5 and 6,5). The greater index of hydrogen production was obtained with anaerobic granular sludge to a temperature of 26 °C and for an interval of pH of 5.5 to 6.5. Using these conditions and inoculum, was used to a pilot system in batch of 3 L of volume of interchange. Was found that the hydraulic retention time and the organic load optimal was 18 h and 0.75 g COD/ (L*day), respectively.

The results of this work allow to establish the basis to develop strategies of optimal control for the biological hydrogen production in sequential batch reactors; combined to this, the work carried out suggests the necessity to standardize the operational parameters of the tests of biological hydrogen production with the purpose of to be able to make comparisons with other experiments of the same nature.

CAPÍTULO 1

Introducción

La intención de este capítulo es enmarcar el proceso de la producción de hidrógeno a partir del tratamiento de aguas residuales. Como se sabe los procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales se dividen de manera general en aerobios y anaerobios; es conocido que en los procesos anaerobios, durante la fermentación, ciertas bacterias producen hidrógeno como subproducto de la degradación de la materia orgánica. El hidrógeno es un elemento que puede ser almacenado en forma líquida y gaseosa, esto representa energía almacenada, se puede quemar como cualquier combustible para producir calor, impulsar un motor o producir electricidad en una turbina; a diferencia del metano y dióxido de carbono, el hidrógeno no es contaminante ya que su único producto resultado de la combustión es el agua. El hidrógeno es un gas incoloro, inodoro y no tóxico, tiene el más alto contenido energético de todos los combustibles, con una densidad energética de 120 kJ/g, siendo alta comparada con la gasolina que es de 45.26 kJ/g.

Por otra parte, las aguas residuales con alto contenido orgánico como lo son las vinazas de la industria tequilera son difícilmente tratadas en forma adecuada. Actualmente en México se generan de 7 a 11 litros de vinazas por cada litro de tequila (Tequila Trade, 2004) y tan solo durante el 2006 se produjeron 242 millones de litros de tequila (CNIT, 2007), lo que indica que se generaron entre 1.7 y 2.7 millones de metros cúbicos al año de vinazas. Al utilizar las vinazas de la industria del tequila como fuente de carbono se contribuiría al tratamiento del agua contaminada generada en esta industria y se obtendría un subproducto de valor comercial como lo es el hidrógeno.

Ahora bien, actualmente en México la Cámara de Diputados ha aprobado la Ley para el Desarrollo y Promoción de los Bioenergéticos, esto con el fin de lograr la autosuficiencia energética del país mediante el uso de energías renovables, impulsando la producción, distribución y comercialización de energías renovables provenientes de la materia orgánica; este hecho indica la necesidad de explorar nuevas líneas de investigación sobre este rubro.

Si bien es cierto que la materia orgánica procedente de aguas residuales es probablemente insuficiente para sostener una economía global basada en el hidrógeno, esta forma de producción de energía renovable puede ayudar a compensar de forma sustancial los costos del tratamiento de las aguas residuales que al final es la meta principal de este trabajo.

1.1 Procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales

Los procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales son utilizados principalmente para remover la materia orgánica disuelta y coloidal. La materia orgánica es metabolizada por los microorganismos presentes en el sistema, de tal forma que mediante una floculación y posterior sedimentación la biomasa formada pueda ser removida. Los procesos biológicos pueden ser aerobios o anaerobios, esto dependiendo del aceptor final de electrones durante el metabolismo bacteriano.

Los procesos anaerobios, en contraste con los procesos aerobios, no requieren presencia de aeradores, lo que significa un ahorro económico, además cuenta con ventajas como: manejar cargas orgánicas altas, en general ocupan poco espacio, producen gran cantidad de biogás y poca biomasa. La biomasa producida tiene aproximadamente el mismo valor por unidad de peso como fertilizante que el lodo producido en un proceso aerobio (Droste, 1997).

Ahora bien, estos procesos pueden complementarse para obtener un tren efectivo en el que se aprovechen las ventajas de ambos, es decir, integrar el procesos anaerobio seguido de uno aerobio como pulimento; esta es una adecuada técnica, en particular cuando se deben cumplir condiciones de descarga estrictas y se tienen efluentes mediana o altamente concentrados en materia orgánica, en tales casos, la etapa anaerobia removerá alrededor del 80% de la materia orgánica con muy limitados costos energéticos y con una baja producción de lodos de desecho, mientras que la etapa aerobia final llevara el efluente a la calidad de descarga deseada, pero con un reducido consumo de energía y limitados lodos de purga, ya que se solo se estarán procesando el 20% de la materia orgánica que se recibe (Noyola, 1998)

1.2 Metabolismo anaerobio

El metabolismo lo consideramos como el conjunto de reacciones bioquímicas que los seres vivos realizan para mantenerse vivos y poder reproducirse. Se divide en catabolismo y anabolismo, siendo el primero el conjunto de reacciones por las cuales la célula obtiene energía y material para la reproducción y el segundo los procesos a través de los cuales la célula utiliza los productos del catabolismo para llevar a cabo la síntesis del celular. Estos dos procesos son independientes entre ellos.

El metabolismo anaerobio en aguas residuales representa un proceso microbiológico complejo que consiste en la mineralización de la materia orgánica hasta metano y dióxido de carbono en ausencia de oxígeno.

Hay tres grandes grupos metabólicos de bacterias esenciales para la completa degradación anaerobia de la materia orgánica a CO_2 y CH_4 en ecosistemas con pocos aceptores endógenos de electrones que no sean CO_2 :

1. Bacterias fermentativas. Utilizan sustratos primarios para producir ácidos grasos saturados, H_2 y CO_2 .
2. Bacterias acetogénicas reductoras obligadas de protones (generadoras de H_2),
3. Metanogénicas. Catabolizan a CO_2 y CH_4 grandes cantidades de acetato y utilizan el H_2 producido para reducir el CO_2 a metano.

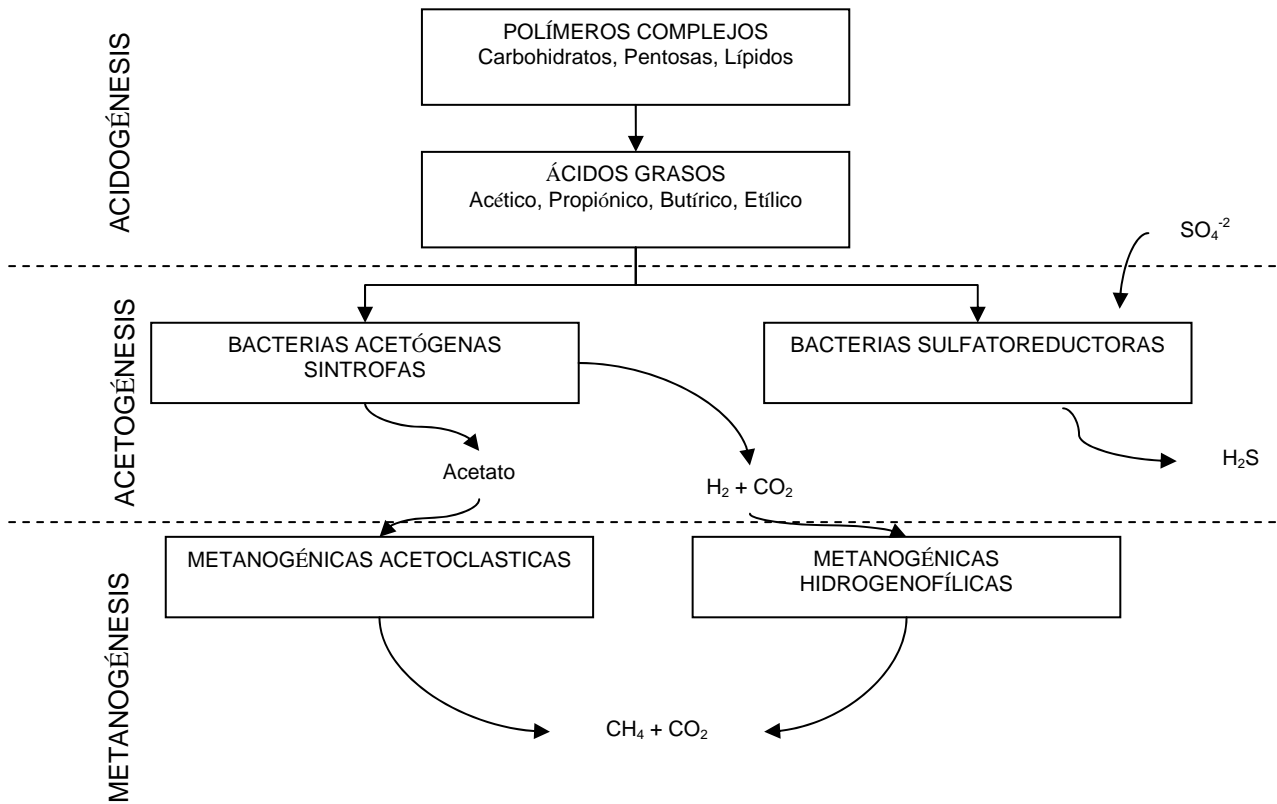


Figura 1.1 Proceso de transformación de la materia orgánica en un proceso de digestión anaerobia.

1.2.1 Acidogénesis

Las moléculas complejas presentes en el sustrato, como proteínas, lípidos y polisacáridos se depolimerizan a azúcares libres, aminoácidos y ácidos grasos volátiles (acético, propiónico, butírico, etc.), alcoholes, CO_2 e hidrógeno.

La hidrólisis de las macromoléculas tales como lípidos, proteínas y carbohidratos bajo condiciones anaerobias en un reactor es primariamente una reacción enzimática extracelular.

Las bacterias hidrolíticas y fermentativas tienen un funcionamiento ligado a la concentración de hidrógeno en el medio; si se encuentran en valores de 5-50 ppm, existe una preferencia hacia la producción de acetato, si rebasa los valores citados, la generación de acetato baja y existe un aumento en la producción de otros ácidos grasos volátiles, este tipo de bacterias son generalmente del género *Clostridium*.

1.2.2 Acetogénesis

En la acetogénesis existen dos grupos de microorganismos: las bacterias homoacetógenas y las bacterias oxidantes de AGV productoras de hidrógeno, las primeras utilizan el CO₂ como aceptor terminal de electrones, produciendo acetato.

Durante esta etapa, los productos de fermentación producidos anteriormente son convertidos en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono por un grupo de bacterias denominadas “bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno”

La particularidad de estas bacterias reside en el hecho de que las reacciones que realizan son inhibidas por el hidrógeno que producen, es necesario entonces que este no se acumule en el medio.

El hidrógeno es un importante intermediario para los acetógenos. Se produce durante la fermentación de carbohidratos y otros sustratos, y en la subsecuente degradación de ácido propiónico y otros ácidos grasos volátiles de alto peso molecular.

1.2.3 *Clostridium*

Estudios recientes sobre los consorcios microbianos presentes en sistemas productores de hidrógeno indican que las especies como *Clostridium*, *Enterobacter* y *Thermoanaerobacter* son predominantes (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2008). Los formadores de esporas del género *Clostridium* son gram-positivos y se mueven por medio de flagelos. El diámetro de las esporas termoresistentes es por lo general superior al de las células vegetativas. Los *Clostridium* se caracterizan fisiológicamente por un marcado metabolismo fermentativo y por su relación con el oxígeno: tan solo crecen en condiciones estrictamente anaerobias.

Durante la fermentación se forman cantidades variables de ácidos (ácido butírico, acético, láctico), de alcoholes (butanol, etanol, isopropanol) así como de acetona y gas (hidrógeno y anhídrido carbónico). Como sustratos se utilizan la glucosa, algunos polisacáridos ácidos orgánicos y alcoholes.

La tabla 1.1 es una adaptación de la presentada por Schlegel (1988) en la que se muestra los principales productos de la fermentación a ácido grasos y alcohol (butanol) por bacterias del género *Clostridium*.

Como ya se ha descrito, la característica de las *Clostridium* es formar esporas termoresistentes, propiedad que se puede aprovechar para enriquecer un medio con este tipo de bacterias.

Tabla 1.1 Bacterias del genero Clostridium que participan en las fermentaciones

Especies de <i>Clostridium</i>	Sustrato	Productos de fermentación
I. Producción de ácido butírico		
<i>C. butyricum</i>	Glucosa, almidón, dextrina.	Butirato, acetato, CO ₂ , H ₂
<i>C. tyrobutyricum</i>	Glucosa o lactato (glicerina)+ acetato	Butirato, acetato, CO ₂ , H ₂
<i>C. pasteurianum</i>	Glucosa, almidón, manitol, inulina.	Butirato, acetato, CO ₂ , H ₂
<i>C. pectinovorum</i>	Pectina, almidón, glucógeno, dextrina.	Butirato, acetato
II. Producción de butanol		
<i>C. butylicum</i>	Glucosa	Butirato, acetato, butanol, 2-propanol, CO ₂ , H ₂
<i>C. acetobutylicum</i>	Glucosa, glicerina, piruvato.	Butirato, acetato, butanol, acetona, acetoína, etanol, CO ₂ , H ₂
III. Producción de ácido propiónico		
<i>C. propionicum</i>	Alanita, treonina.	Acetato, propianato, CO ₂

Adaptación de Schlegel, 1988

1.3 Producción de hidrógeno

El hidrógeno en estado puro, no está presente en la naturaleza, pero existe asociado a otras estructuras. Por ese motivo no puede ser explotado como el petróleo o el carbón, debiendo ser obtenido o generado a partir de otros compuestos químicos.

La producción de hidrógeno no es novedosa. Durante el 2005 el mundo produjo, almacenó, transportó y usó cerca de 500 mil millones de metros cúbicos (millardos ó 10⁹ m³) en el año. Eso sucede en su mayor proporción en las industrias química y petroquímica.

Las formas tradicionales de separación u obtención son:

- a) Por generación química
- b) Por generación electrolítica
- c) Por producción biológica

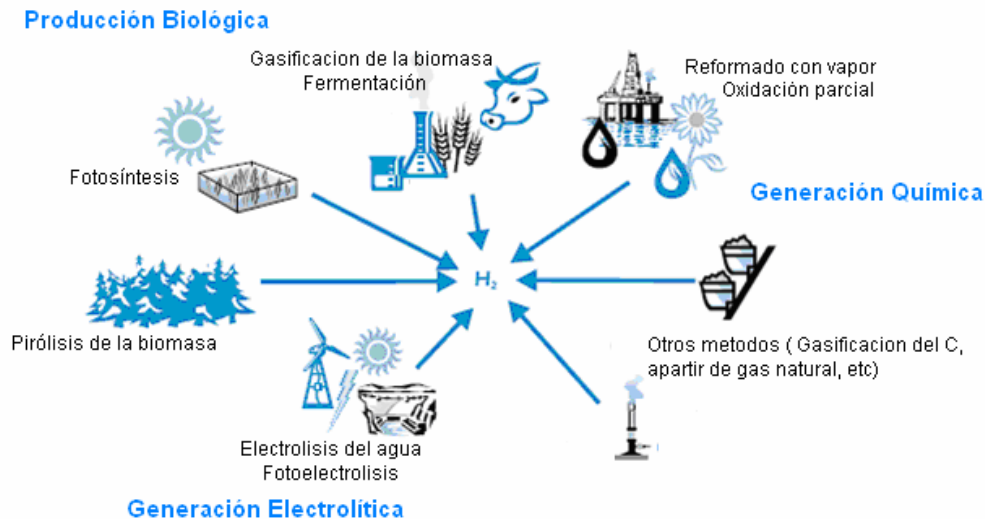


Figura 1.2 Principales formas de generación de hidrógeno.

1.3.1 Generación química

En la actualidad, prácticamente el 95% del hidrógeno que se produce es a partir de fuentes fósiles (gas natural, petróleo, etc.) o es obtenida como subproducto en procesos químicos. Gran cantidad es obtenida por electrólisis de cloro – álcalis y de procesos de refinado de petróleo. Los procesos para generar hidrógeno de combustibles fósiles son los siguientes:

Reformado con vapor: Con este procedimiento el hidrógeno se obtiene a partir de hidrocarburos, fundamentalmente del gas natural. El principal componente del gas natural es metano y la reacción consiste en separar el carbono del hidrógeno. El proceso tiene lugar en dos etapas: En la fase inicial, el gas natural se convierte en hidrógeno, dióxido de carbono y monóxido de carbono. La segunda etapa consiste en producir hidrógeno adicional y dióxido de carbono a partir del monóxido de carbono producido durante la primera etapa. El monóxido de carbono es tratado con una corriente de vapor a alta temperatura produciéndose hidrógeno y dióxido de carbono. El CO₂ y otros componentes indeseados son separados posteriormente de la mezcla de gases mediante la absorción de membranas separadoras. El hidrógeno producido, se almacena en tanques.

La mayoría del hidrógeno empleado por la industria petroquímica se genera de esta manera. El proceso tiene una eficiencia entre el 70 y el 90%. Las reacciones químicas producidas durante el proceso son las siguientes:



Oxidación parcial de combustibles fósiles con deficiencia de O₂: La oxidación parcial es una conversión térmica de hidrocarburos pesados (como por ejemplo residuos de refinado de aceite o diesel) con oxígeno y en ocasiones con vapor de agua adicional. Se obtiene una mezcla de hidrógeno que posteriormente se purifica. Las cantidades de

oxígeno y vapor de agua se controlan para que la gasificación continúe sin necesidad de aporte de energía.

Procedimientos de obtención modernos: Potencialmente es posible la generación de hidrógeno sin producir emisiones de CO₂ mediante procesos modernos a partir del gas natural usando energía eléctrica. Desde los comienzos de los años 80 se está desarrollando el proceso de plasma-arco en el cual a 1600° C desdoblan hidrocarburos en hidrógeno y carbón activado. Este proceso no origina emisiones considerables pero requiere, además de las fuentes primarias de energía (petróleo o gas natural), energía eléctrica y agua de enfriamiento. Como producto secundario se obtiene vapor sobrecalentado con una potencia de 1000 kW. Considerando la potencialidad de todos los productos empleados, el proceso opera con una eficiencia de casi el 100%. De este producido, alrededor del 48% es contenido de hidrógeno, 10% lo constituye el vapor recalentado y el 40% restante resulta carbón activado (<http://www.aah2.org.ar/produccion.>).

1.3.2 Generación electrolítica

Para generar hidrógeno a partir del agua, la electrólisis es actualmente una buena alternativa. Una gran ventaja de este método de obtención es que permite la obtención del hidrógeno en estado puro.

Como la generación de hidrógeno por medio de electrólisis del agua usa energía eléctrica, este proceso es económico solamente en aquellas regiones del planeta donde la energía eléctrica pueda ser producida en forma muy económica. Este es el caso de las grandes plantas hidroeléctricas.

Otra forma económica es mediante la generación eoloeléctrica, aun así, el proceso electrolítico es más caro que el reformado de gas natural con vapor antes descrito, pero es absolutamente limpio y además permite el aprovechamiento del oxígeno producido también en forma pura para múltiples usos, incluidos los medicinales.

Los procesos electrolíticos son prácticamente dos:

Electrólisis del agua: El paso de la corriente eléctrica a través del agua, produce una disociación entre el hidrógeno y el oxígeno, componentes de la molécula del agua. El hidrógeno se recoge en el cátodo y el oxígeno en el ánodo.



Fotoelectrólisis. Básicamente, este procedimiento aprovecha la radiación solar para generar la corriente eléctrica capaz de producir la disociación del agua y en definitiva la producción de hidrógeno.

1.3.3 Producción biológica

Existen distintos procesos biológicos en los que el hidrógeno es liberado o producido como un producto intermedio. En principio se pueden distinguir cuatro tipos de procesos:

Gasificación de biomasa: Se trata de someter a la biomasa a un proceso de combustión incompleta entre 700 y 1200°C. El producto resultante es un gas combustible compuesto fundamentalmente por hidrógeno, metano y monóxido de carbono.

Pirólisis de la biomasa: Es la combustión incompleta de la biomasa en ausencia de oxígeno, a unos 500°C. Se obtiene carbón vegetal y gas mezcla de monóxido y dióxido de carbono, hidrógeno e hidrocarburos ligeros.

Fotosíntesis: En este proceso el hidrógeno es producido por algas. Tiene el inconveniente de que debe contar con un estricto control, por una parte necesita oxígeno para la fotosíntesis, pero la presencia de este inhibe a la hidrogenasa que es la enzima generadora de hidrógeno (Jonquera et al , 2001).

Fermentación: Las bacterias, por medio de su metabolismo producen el hidrógeno en condiciones anaerobias.

Estos métodos de generación de hidrógeno están aún en estado de desarrollo ya que poseen eficiencias extremadamente bajas, pero existen opciones complementarias para una economía del hidrógeno futura.

1.4 Generación de hidrógeno vía fermentación

Una de las preguntas que pueden resultar en este estudio es ¿Cómo se obtiene el hidrógeno que se produce?, para dar respuesta a esta situación veamos la ruta de degradación de la glucosa hasta los productos de la fermentación realizado por las bacterias *Clostridium*.

La figura 1.4 describe el proceso de fermentación de la glucosa por grupos del género *Clostridium*. La glucosa se convierte en piruvato, 2 moles de piruvato por mol de glucosa, y este a su vez es transformado en acetil-CoA e hidrógeno. El acetil-CoA es entonces reducido a productos de la fermentación.

Ahora bien, la conversión del piruvato en acetil-CoA es una reacción de oxidación y hay entonces un exceso de electrones generados en el sistema, este exceso explica la producción del hidrógeno ya que con esta generación existe un equilibrio de electrones. Los protones (H^+) derivados del agua sirven como aceptores de electrones en la producción de hidrógeno, esta producción se asocia con la presencia en el organismo de una ferrosulfoproteína denominada ferredoxina, el transporte de electrones desde la ferredoxina a H^+ es catalizado por la enzima hidrogenasa, este proceso lo podemos visualizar en la figura 1.5.

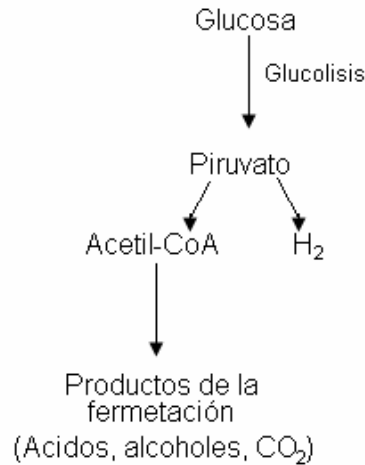


Figura 1.3 Fermentación de la glucosa por bacterias del género Clostridium (Modificado de Madigan, 2004)

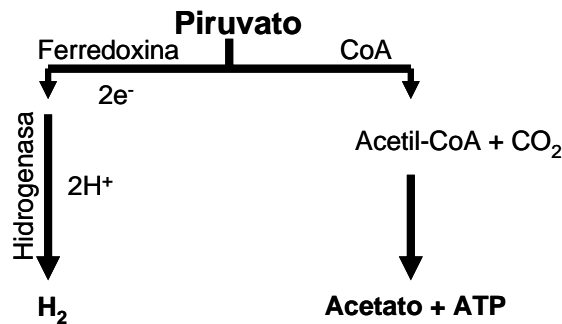


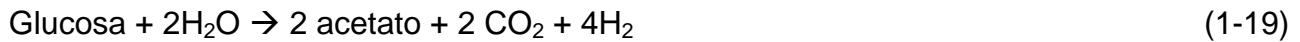
Figura 1.4 Producción de hidrógeno molecular y acetato a partir de piruvato (Madigan, 2004)

Diferentes rutas de la fermentación de la glucosa con producción de hidrógeno se han propuesto, las mas comunes se encuentran numeradas en la tabla 1 (Mu et al, 2007).

Tabla 1.2 Principales reacciones durante la fermentación de la glucosa

Reacciones	Proceso
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$	Producción de ácido acético (1-4)
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$	Producción de ácido butírico (1-5)
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$	Producción de ácido propiónico (1-6)
$3C_6H_{12}O_6 \rightarrow 4CH_3CH_2COOH + 2CH_3COOH + 2CO_2 + 2H_2O$	Producción de propianato y acetato (1-7)
$CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2H_2$	Consumo de butirato (1-8)
$CH_3CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + 3H_2 + CO_2$	Consumo de propianato (1-9)
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH$	Producción de ácido láctico (1-10)
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3CH_2OH + CO_2$	Producción de ácido láctico/etanol (1-11)
$2C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CH_3COOH + 2CH_3CHOHCOOH$	Producción de ácido láctico/etanol (1-12)
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$	Producción de etanol (1-13)
$CH_3CHOHCOOH + H_2 \rightarrow CH_3CH_2COOH + H_2O$	Reducción de lactato (1-14)
$CH_3CHOHCOOH + H_2O \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + 2H_2$	Oxidación de lactato (1-15)
$3CH_3CHOHCOOH \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O$	Fermentación láctica (1-16)
$4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O$	Consumo de hidrógeno (1-17)
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CH_3COOH$	Acetogénesis (1-18)

De manera general, Hallenbeck (2005) menciona que durante la fermentación de la glucosa para producir hidrógeno por bacterias *Clostridium*, se forman principalmente acetato y butirato, bajo la siguiente estequiometría:



1.5 Producción de acetona, butanol y etanol por bacterias *Clostridium*: una limitante en la producción de hidrógeno.

Como se ha mencionado, el hidrógeno se produce de forma biológica generalmente por bacterias del género *Clostridium*, y es importante este dato ya que años atrás este mismo tipo de bacterias se utilizaban para producir acetona, butanol y etanol de manera industrial; a este conflicto metabólico se le debe poner especial interés, ya que si no se consideran las condiciones del proceso, este en lugar de producir hidrógeno como principal producto, se puede inclinar hacia la producción no deseada de solventes.

1.5.1 Fermentación acetona-butílica

El butanol y la acetona (además del ácido butírico y el isopropanol) se obtienen a través de una fermentación cuyos sustratos iniciales son productos lignocelulósicos: almidón, melazas, sacarosa, hidrolizados de madera y pentosas. El microorganismo encargado de la transformación es del género *Clostridium*. Según la cepa utilizada y las condiciones en las que se desarrolle la fermentación varían las proporciones de los distintos productos obtenidos. Según la fermentación

- Clostridium acetobutylicum* participa en la fermentación de la acetona y butanol.
- Clostridium butylicum* en la de butanol e isopropanol.
- Clostridium butyricum* en la de ácido acético y ácido butírico.

En la fermentación ABE (acetona-butanol-etanol) los productos obtenidos son: acetona, butanol, acetato, butirato, etanol, H₂ y CO₂. El hidrógeno resultante puede ser usado para la producción de metanol sintético y en la hidrogenación de aceites comestibles. El dióxido de carbono es comprimido o transformado en hielo seco. Los residuos sólidos contienen grandes cantidades de riboflavina (vitamina B2) y puede ser usada como alimento suplementario para animales rico en proteínas.

1.5.2 Descripción del proceso

La fermentación acetobutílica está ligada a una bacteria anaerobia esporulada denominada *Clostridium acetobutylicum* donde el esquema metabólico de degradación de azúcares es una variante de la fermentación butírica. En lugar de producir ácido acético y ácido butírico, los reduce a una mezcla de disolventes donde concurren butanol, que es el producto principal, y acetona a la cual se le adiciona un poco de etanol (a esto se lo denomina mezcla ABE).

En la figura 1.6 muestra cómo se forman los ácidos, acético y butírico, y los disolventes, butanol-acetona y etanol, a partir de la CoA por *Clostridium acetobutylicum*: la degradación de los azucares hasta la CoA se lleva a acabo por la ruta Embden-Meyerhof-Parnas

El balance energético de la producción de ácidos es mejor comparado con el de la producción de disolventes. La generación de hidrógeno es menor durante la producción de los solventes que en la de los ácidos (Jones y Woods, 1986).

Las siguientes ecuaciones muestran los balances de las reacciones a partir de glucosa como sustrato:

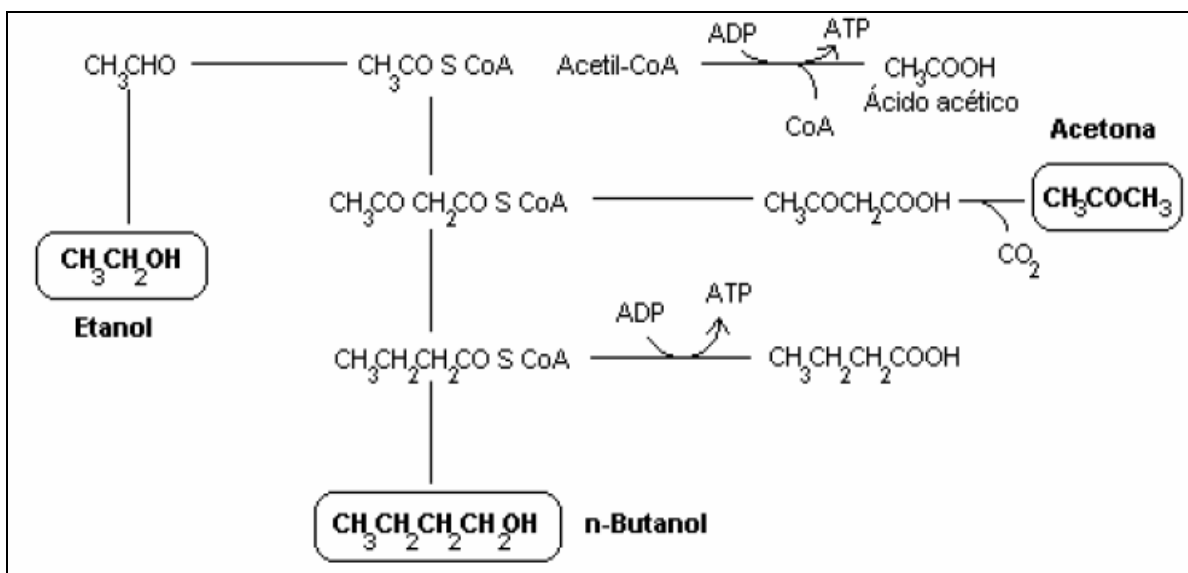
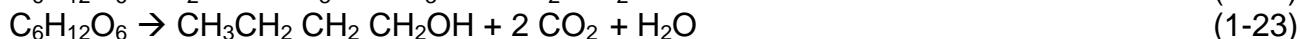


Figura 1.5 Producción de acetona, butanol y etanol durante la fermentación por especies *Clostridium*

Se dan dos fases bien diferenciadas: una es la llamada fase de acidogénesis en la que se lleva a cabo el crecimiento y en la que se producen ácidos (acético y butírico). Es la más eficaz desde el punto de vista energético, lo que genera un descenso en el pH. La producción de gas produce una mezcla compuesta de cantidades aproximadamente equivalentes en volumen de hidrógeno y gas carbónico. Trascurrido cierto tiempo el crecimiento se detiene (se trata de la segunda fase). Se alcanza el punto máximo de la biomasa producida y posteriormente tiende a disminuir con mayor o menor rapidez mientras que las bacterias efectúan su esporulación. Se producen los disolventes a partir de los azúcares existentes. Al mismo tiempo, los ácidos producidos en la fase de crecimiento en su mayoría son reconsumidos y convertidos también en disolventes, lo que provoca un aumento del pH. La relación H_2/CO_2 en el gas de fermentación que se produce casi alcanza el 0.35 en esta fase. Las proporciones relativas de los diferentes disolventes, aunque varían según las cepas y los sustratos, están comprendidas entre: 60- 75% para el butanol, 25-35% para la acetona y 1-10% para el etanol.

El conocer las diferentes rutas metabólicas del consorcio microbiano presente en nuestro sistema de estudio y las condiciones a las que se llevan a cabo, permite tener una visión sobre cual será el comportamiento de nuestro proceso y de esta forma poder identificar anomalías en el mismo o bien simplemente explicar el por qué de los resultados obtenidos. De igual forma, el conocer las rutas metabólicas evita divagar sobre el proceso de estudio.

1.6 Reactor discontinuo secuencial (SBR)

El aplicar un proceso biológico a efluentes con cargas orgánicas altas o bien efluentes complicados de degradar no dejan muchas alternativas de qué sistema utilizar. En nuestro caso en donde además queremos tener un control en la producción de biogás se dificulta esta situación. Un reactor discontinuo secuencial (SBR) es muy flexible y adecuado para la variación de concentraciones de los influentes. La flexibilidad del reactor SBR es una de las mayores ventajas con respecto a otro tipo de reactores y permite que la operación sea sincronizada para mantener al máximo las eficiencias.

Generalmente los SBR operan bajo cinco fases bien definidas que son: llenado, reacción, sedimentación, vaciado y tiempo muerto (Figura 1.7). Las diferentes versiones de los SBR incluyen influentes continuos y/o periódicos y distintas fases de reacción, sedimentación y vaciado. El proceso SBR puede trabajar con biomasa suspendida, fija o una mezcla de ambos.

En el proceso para la producción de hidrógeno, el ciclo de reacción comenzaría con la fase de llenado, en la cual el reactor es alimentado con el agua residual que hará las veces de sustrato para el consorcio microbiano utilizado. Dependiendo del objetivo del proceso esta fase puede subdividirse en un llenado estático (no existe agitación, permitiendo la acumulación del sustrato) y llenado con mezclado. En general la degradación de los sustratos comienza durante la fase de llenado y continúa durante la fase de reacción, para posteriormente pasar a la sedimentación que es la separación de la biomasa del agua tratada, esto se realiza dejando el tanque en reposo, de tal manera que la biomasa se

vaya al fondo del reactor. Durante el vaciado, el agua libre de la mayor parte de biomasa (que se encuentra en la parte superior del reactor) es drenada, con lo cual en el tanque de reacción solo queda la biomasa con un remanente de agua. El porcentaje de líquido drenado es conocido como volumen de intercambio. Generalmente se considera que un ciclo de SBR termina con la fase de vaciado.

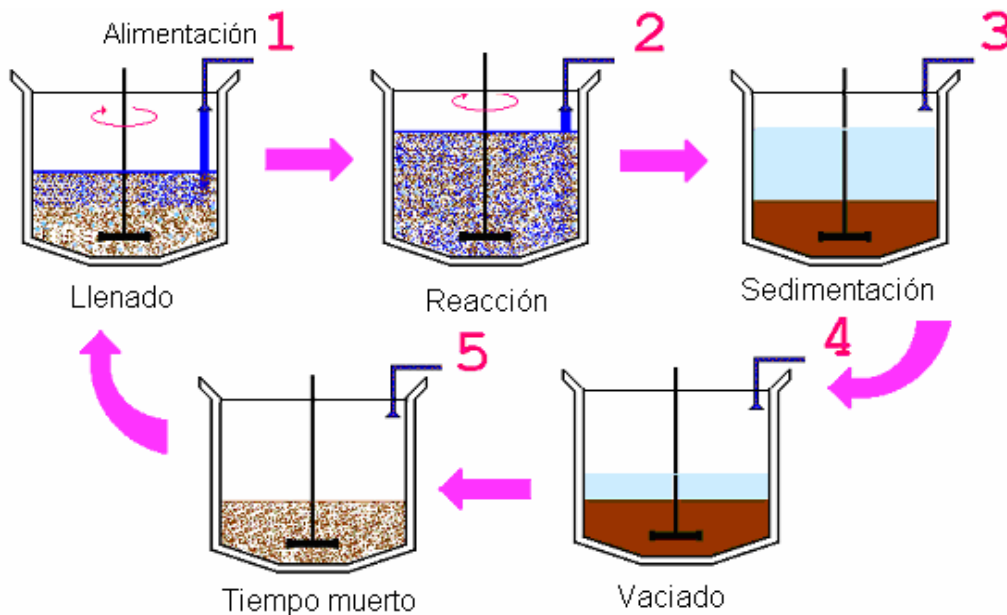


Figura 1.6 Fases típicas de un SBR

El tiempo muerto es el tiempo entre el vaciado y el llenado (si el sistema tiene una capacidad superior a la necesaria para tratar el agua residual que entra a la planta, el tiempo muerto será mayor). Esta etapa del SBR puede ser eliminado o acomodado entre otras fases de acuerdo a las necesidades del proceso.

Algunas ventajas de los SBR sobre los procesos continuos son: en los procesos discontinuos secuenciales después de varios ciclos de operación se establecen comunidades con actividad degradadora alta y estable especializadas en el proceso; son flexibles en su operación; se disminuyen los costos de inversión puesto que se elimina el sedimentador secundario (el mismo tanque funciona como reactor y como sedimentador); se obtienen lodos con excelentes características de sedimentabilidad debido a la actividad cíclica del reactor; se controla el problema de esponjamiento de lodos ya que los microorganismos filamentosos son controlados por la alta variación en la concentración de sustratos; debido a su flexibilidad es posible la total automatización y aplicación de estrategias de control en el reactor.

1.7 Vinazas

Las vinazas son un líquido con partículas en suspensión, de color marrón y olor característico al proceso de procedencia. Debido a algunas de sus características como pH bajo, materias en suspensión, elevada DQO y contaminantes como fenoles, sulfatos, entre otros minerales, se considera un residuo líquido muy agresivo que provoca serios problemas ambientales en los lugares en los que se descarga. Para su tratamiento se han ensayado métodos físico-químicos (Meza et al, 1996) , químicos (Pandiyan et al, 1999) y biológicos (Bermúdez-Savón et al, 2000, Iñiguez et al, 2005), sin embargo, en estos últimos una concentración tan elevada de materia orgánica descarta por completo el tratamiento de estos efluentes utilizando procesos convencionales tales como los procesos aerobios en los que la carga orgánica máxima que se puede tratar fluctúa entre 1 y 2 kg DQO/m³d. Lo anterior ha generado que dichos efluentes sean descargados al medio ambiente sin tratamiento alguno y es esta situación lo que no permite un desarrollo sostenible a las empresas generadoras de vinazas ya sean sectores en crecimiento como la industria del tequila o los tradicionales como los ingenios azucareros.

CAPÍTULO 2

Antecedentes

Actualmente, el hidrógeno es producido principalmente a partir de combustibles fósiles como el gas natural y las naftas. Sin embargo, esta práctica es una contradicción ambiental, puesto que se genera un combustible limpio a partir de una fuente contaminante y limitada (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2008).

Se ha revisado que la producción de hidrógeno por acción biológica es posible de llevarse a cabo; sin embargo, lo anterior ha sido lo que menciona la teoría de libros antiguos, donde no se vislumbraba el utilizar los bioprocesos para producir hidrógeno, mucho menos durante el tratamiento de aguas residuales. Hoy en día producir hidrógeno de manera biológica es un tema interesante de estudio y diversas investigaciones se enfocan a determinar qué tipo de bacterias son las que producen hidrógeno (Hallenbeck, 2005; Debabrata et al., 2001), qué sustrato utilizar (Naik et al., 2005 y Logan et al., 2002), la factibilidad de implementar plantas piloto (Lay et al., 2005), el pre-tratamiento al inóculo (Shizas y Bagley, 2005 y Venkata et al., 2006).

En este capítulo se lleva a cabo una revisión bibliográfica de investigaciones actuales sobre el tema de interés: producir hidrógeno en sistemas biológicos. Se plantea la necesidad de implementar una metodología para determinar la posibilidad de producir hidrógeno a partir de un sustrato determinado, análoga a una prueba de biodegradabilidad anaerobia. De igual forma se busca conocer “números” de cuanto es lo que se ha logrado en el tema de investigación y con que se ha estado trabajando recientemente. El conocer los logros en el tema es esencial para fijar metas y orientar la investigación.

2.1 Producción biológica de hidrógeno

La producción biológica de hidrógeno vía fermentación, como se mencionó anteriormente consiste en la generación de hidrógeno como resultado de los procesos metabólicos de ciertas bacterias. En general, el sustrato (sustancia orgánica compleja) es transformada a hidrógeno, CO₂, ácidos grasos volátiles (AGV's), alcoholes, CH₄ y biomasa.

Las pruebas de producción biológica de hidrógeno nos muestran un panorama sobre la factibilidad de aplicar este proceso a un efluente, es decir, la información que esta prueba proporcione nos permitirá saber cual será la producción máxima de hidrógeno, el

porcentaje de remoción de carga orgánica y los factores que pudiesen inhibir el proceso. El experimento consiste en exponer a la materia orgánica (sustrato) a una población de microorganismos y medir la producción de biogás (hidrógeno) generada por el metabolismo de los microorganismos, esto en condiciones anaerobias. Lo básico que hay que tener en cuenta para iniciar la prueba es el inóculo que se utilizará (población microbiana), el sustrato (materia orgánica a degradar), la técnica para medir el biogás producido, la técnica para determinar la composición del biogás y el tiempo que se prevé durará la prueba. La conversión del proceso se determina en función de la cantidad de hidrógeno producida y cantidad teórica de producción máxima de hidrógeno.

Se han realizado distintos estudios sobre la producción de hidrógeno, cada uno ha contado con una metodología específica, esto debido a que es un tema de estudio relativamente nuevo y no hay una estandarización en las técnicas a utilizar. En la tabla 2.1 se muestran las metodologías más representativas para realizar esta prueba.

Tabla 7.1 Diferentes estudios realizados para producir hidrógeno

	Inóculo	Sustrato	Volumen del reactor	Condiciones	Medición del biogás
Mizuno et al., 2000	Lodo de fermentador, 50 mL; aclimatado	10g de glucosa/L	V=2.5 L; V _T = 2.3 L	T= 35± 1°C; pH= 6; 100 rpm	Continua
Fang et al., 2002	Lodo de digestor anaerobio, 10 g SSV/L	25g de sucrosa/L	V= 3 L	T= 26± 1°C; pH= 5.5	Desplazamiento de agua
Logan et al., 2003	Lodo de digestor anaerobio, 0.5g; pretratamiento termico 104°C (2h)	3 g de DQO/L	V= 294 mL; V _T = 250 mL	T= 25± 1°C; pH= 6.2	Sistema respirometrico
Fan et al., 2004	Estiércol de vaca, 4 g; pretratamiento termico 104°C (2h)	2 – 6 g de sucrosa/L	V = 100 mL; V _T = 65 mL	T= 36± 1°C; pH= 4.5-6.5; 150 rpm	Método manometrico
Lay et al., 2005	Composta, pretratamiento termico 85°C (3h)	3% del volumen del reactor	V = 10 L;	T= 40± 1°C; pH= 5.0-6.5	Medidor de gas húmedo

2.2 Factores que afectan las pruebas de producción biológica de hidrógeno

Durante este estudio se considera que existen factores que pueden afectar cuantitativamente a la producción biológica de hidrógeno, tales como el origen y pretratamiento del inóculo, la temperatura, el pH, composición del medio, agitación, la relación de espacio gaseoso/espacio líquido en el reactor, la relación S_0/X_0 , así como la forma de medir el biogás producido. En esta sección se describirá brevemente estos efectos.

Origen y pretratamiento del inóculo. El origen del inóculo es determinante en los resultados de una prueba de biodegradabilidad anaerobia, ya que cada inóculo cuenta con características y consorcio microbiano diferentes (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004) y por otra parte el pretratamiento que se le aplique al inóculo puede influir en las características del consorcio presente, de ahí la importancia de elegir un inóculo que se considere influya de manera positiva en la producción biológica de hidrógeno y aplicarle un tratamiento adecuado que beneficie la adaptación del inóculo al proceso.

Temperatura. La temperatura ejerce dos efectos en los microorganismos: al aumentar, las reacciones químicas y enzimáticas de las células son más rápidas, sin embargo, por encima de cierta temperatura algunas proteínas pueden sufrir daños irreversibles y puede ocurrir una lisis térmica (Madigan *et al.*, 2004), debido a esto se debe de trabajar con la temperatura óptima para el proceso, la evaluación de la temperatura debe de ser respecto a la producción de hidrógeno, Ueno *et al.* encontraron que la temperatura óptima para producir hidrógeno en procesos biológicos es alrededor de los 40°C.

pH. Cada organismo tiene un rango de pH en el cual es más viable su metabolismo (Madigan *et al.*, 2004), aunado a esto, como se ha mencionado en secciones anteriores en la producción biológica de hidrógeno, durante el metabolismo bacteriano se llevan a cabo reacciones de oxidación-reducción, de ahí la importancia del pH en este proceso, Para esta prueba se prefieren condiciones ligeramente ácidas (5.0-6.5) (Fang y Liu, 2002)

Composición del medio. El objetivo del metabolismo es la supervivencia y la reproducción, para llevar a cabo estas funciones las bacterias requieren ciertos nutrientes. El objetivo de usar una solución de nutrientes en la prueba de producción biológica de hidrógeno es cubrir las necesidades fisiológicas de los microorganismos y evitar limitaciones en la producción de hidrógeno por este factor (Buitrón y Moreno, 1997).

Agitación. La agitación adecuada permite tener un contacto óptimo y homogéneo entre los microorganismos y el medio, además de que ayuda a la rápida salida del biogás a través de la fase líquida. Estudios mencionan que la agitación incrementa la velocidad de reacción y reduce los tiempos de reacción (Moreno *et al.*, 1999)

Relación de espacio gaseoso/espacio líquido en el reactor. Aunque no ha sido muy estudiado el efecto que puede causar esta relación, se sabe que entre menos espacio

gaseoso haya en el sistema, menos reproducible es la prueba (Salazar, 2006), sin embargo, se debe de contar con la fase líquida necesaria para que se lleven a cabo los procesos metabólicos de las bacterias.

Relación So/Xo. La relación inicial sustrato/microorganismos representan la cantidad de nutrientes (carbono y energía) proporcionados al sistema con relación a la cantidad de microorganismos dispuestos para consumirlos. En las pruebas de biodegradabilidad anaerobia este es un factor importante ya que influye en parámetros como el tiempo de latencia y la actividad de degradación (Moreno-Andrade, 2003)

Medición el biogás producido. Este es un parámetro que no afecta de forma directa al proceso de producción de hidrógeno, pero puede influir seriamente en la interpretación de los resultados, ya que una medición deficiente, tanto en la metodología como el instrumental utilizado, pueden dar resultados no verídicos.

Para la realización de los experimentos en este trabajo de investigación se tomarán en cuenta los anteriores parámetros, utilizando los valores óptimos que la literatura menciona.

2.3 Reactor productor de hidrógeno

Para fines de investigación se han usado diferentes prototipos de reactores a nivel laboratorio para estudiar el proceso de producción biológica de hidrógeno, algunos casos son los que se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 7.2 Características de los diferentes sistemas utilizados para producir hidrógeno a nivel laboratorio

Fuente	Tipo de reactor	Capacidad	Sustrato	Inóculo	Rendimiento
Mizuno et al, 2000	Reactor anaerobio continuo y mezclado	2.5 L (2.3 L volumen de trabajo)	Medio Glucosa-Sales minerales	Microflora (predominante <i>Clostridium</i> sp.) de un fermentador.	0.85 ± 0.32 mol H ₂ /mol glucosa Burbujeado con N ₂ : 1.43 ± 0.12 mol H ₂ /mol glucosa
Fang et al, 2002	Fermentador (Biostat B, B. Mraun Biotech)	3 L (1.7 L volumen de trabajo)	Medio Glucosa-Sales minerales	Lodo de un reactor productor de H ₂ a partir de sucrosa	2.1 ± 0.1 mol H ₂ /mol glucosa
Chang et al, 2002	Biorreactores de lecho fijo	(1) 0.3 L (2) 3 L	Medio Sucrosa-Sales minerales	Lodo de PTAR municipal pretratado químicamente	(1) 0.0965 L/h/g SSV (2) 0.0828 L/h/g SSV
Gong et al, 2005	Reactor anaerobio continuo y mezclado	2.5 L	Melazas con sales minerales	Lodo de agua residual	276 mL/g SSV/d

Tabla 2.2 Características de los diferentes sistemas utilizados para producir hidrógeno a nivel laboratorio (cont.)

Fuente	Tipo de reactor	Capacidad	Sustrato	Inóculo	Rendimiento
Lay et al, 2005	Bioreactor	10 L	Agua residual de la industria cervecera (3%) y sales minerales	Composta (de césped) pretratada	674 mL/g SSV/d
Mu et al, 2006	Fermentador (Baoxin Biotech Ltd.)	5 L(3 L volumen de trabajo)	Medio Sucrosa-Sales minerales	Lodo pretratado de un UASB piloto	143 mL/g Sustrato
Fan et al , 2006	Reactor anaerobio continuo y mezclado	2 L	Agua residual de la industria cervecera (diluida) y sales minerales	Composta (de abono de ganado) pretratada	43.1 mL/ g DQO
Wang et al, 2007	UASB	4 L	Medio Sucrosa-Sales minerales	Lodo pretratado de un UASB piloto	1.51±0.32 mol H ₂ /mol glucosa

Tal como se observa en la tabla anterior, una diversidad de sistemas se han utilizado para evaluar la producción biológica de hidrógeno, sin embargo se puede recalcar que los resultados obtenidos varían no tanto por el sistema utilizado, si no mas bien por las condiciones, sustrato e inóculo utilizados. En los casos planteados el mayor rendimiento observado en relación molar fue el obtenido por Fang et al. (2002) de 2.1 ± 0.1 mol de H₂/mol glucosa y en relación a la biomasa utilizada lo obtuvo Yang Mu et al. (2006) siendo de 143 mL de H₂/g SSV. En ambos casos se utilizaron sustratos fácilmente biodegradables (glucosa y sacarosa respectivamente) y el inóculo utilizados provenían de sistemas pilotos anaerobios, en el caso de Fang de un piloto productor de hidrógeno, por lo anterior podemos considerar que la biomasa usada seguramente se encontraría enriquecida de bacterias productoras de hidrógeno. Lo anterior confirma la importancia de elegir una buena fuente de inóculo para esperar obtener buenos resultados respecto al rendimiento del sistema. En el caso de Lay et al. (2005) se obtuvo una buena producción de hidrógeno (674 mL/g SSV/d) en un reactor de capacidad considerable (10 L) usando un sustrato proveniente de la industria cervecera, este es un claro ejemplo de la factibilidad de usar el proceso de producción de hidrógeno en residuos industriales cargados sustancialmente de materia orgánica.

CAPÍTULO 3

Hipótesis y Objetivos

3.1 Hipótesis

Utilizando un inóculo adecuado, en condiciones ligeramente ácidas y mesofílicas, se obtendrá una máxima producción de hidrógeno durante la biodegradación de vinazas de la industria tequilera.

3.2 Objetivo general

Determinar y evaluar las condiciones de operación más adecuadas para producir hidrógeno en un reactor piloto de 6 L a partir de la biodegradación de vinazas de la industria tequilera.

3.3 Objetivos particulares

- Implementar la metodología para el desarrollo de la prueba de producción biológica de hidrógeno.
- Seleccionar el inóculo adecuado para la producción biológica de hidrógeno a partir de cuatro inóculos diferentes
- Evaluar la influencia del pH y temperatura sobre la producción biológica de hidrógeno.
- Evaluar la producción de hidrógeno utilizando un agua residual industrial con alto contenido orgánico (Vinazas)
- Montar, operar y determinar el TRH y la carga orgánica máxima para producir hidrógeno en un sistema piloto anaerobio discontinuo secuencial.

CAPÍTULO 4

Metodología General

En cualquier investigación es importante plantear desde el inicio cual será la metodología a llevarse a cabo, en nuestro caso: planear el experimento, entendiéndose experimento como una prueba o serie de pruebas en la que se modifican de manera dirigida las variables de entrada para observar e identificar las razones que originan los cambios en las variables de respuesta, esto con el fin de que se obtengan datos apropiados para posteriormente hacer un análisis de los mismos y poder realizar conclusiones válidas y objetivas.

En este capítulo se plantean los experimentos realizados para evaluar los parámetros operacionales de un sistema biológico productor de hidrógeno a partir de vinazas tequileras; se hace referencia al pretratamiento que se le aplica al inóculo con el fin de enriquecerlo de bacterias productoras de hidrógeno, se especifica en qué consiste la prueba de producción biológica de hidrógeno propuesta en esta investigación, se detalla el reactor piloto a nivel laboratorio y se describen los análisis que se consideraron pertinentes en los experimentos. Posteriormente en cada capítulo se describe la metodología detallada de cada uno de los pasos estudiados.

4.1 Plan experimental

Se planearon cuatro etapas para el desarrollo de la investigación (Figura 4.1), en la etapa 1 y 2 se desarrollaron pruebas de producción biológica de hidrógeno (descritas en la sección 4.3) con agua sintética. En la primera etapa con el fin de seleccionar el inóculo, se evaluaron cuatro fuentes de este a pH y temperatura constantes; en la segunda etapa se utilizó el inóculo que mostró el mayor índice de producción de hidrógeno para evaluar la influencia del pH y la temperatura sobre los experimentos.

Una vez seleccionado el inóculo y las condiciones óptimas de operación para la realización de la prueba de producción biológica de hidrógeno, en la etapa 3 se aplicó esta técnica a dos tipos de vinazas para evaluar la capacidad de éstas para producir hidrógeno durante su biodegradación.

Finalmente en la etapa 4 se montó un reactor piloto de 5L en donde se aplicaron los resultados obtenidos en las etapas anteriores y se determinó el TRH óptimo y la carga orgánica adecuada para el sistema.

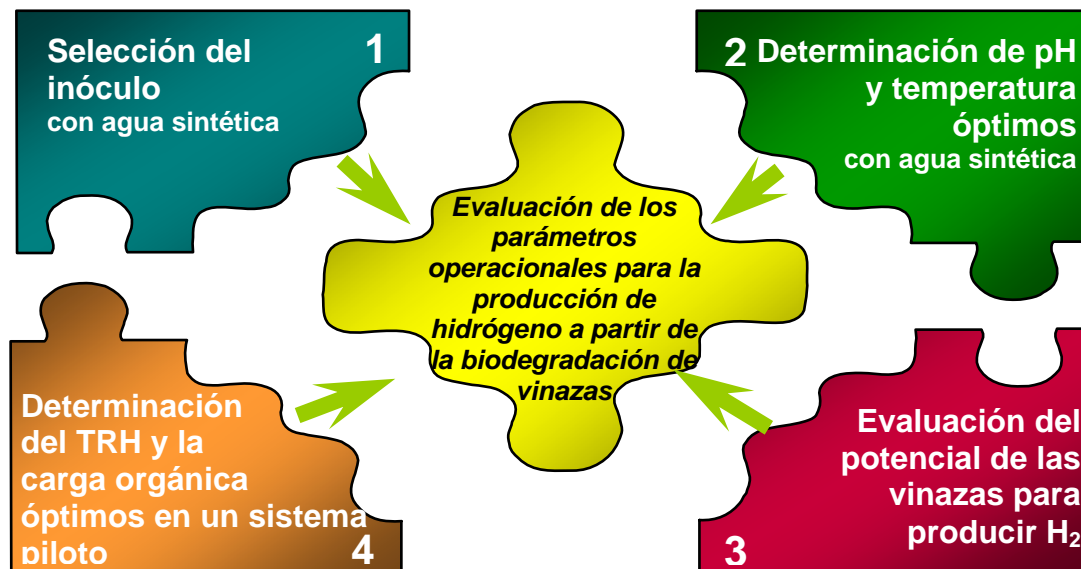


Figura 4.1 Diagrama del plan experimental

4.2 Pretratamiento del inóculo

Como ya hemos mencionado las principales bacterias productoras de hidrógeno son las del genero *Clostridium*, las cuales tienen la capacidad de formar esporas a altas temperaturas, esta propiedad es aprovechada para que aplicando un tratamiento térmico se lleve acabo una selección de flora microbiana, es decir, se busca la eliminación de las bacterias consumidoras de hidrógeno (metanogénicas) y a su vez la concentración de bacterias productoras de hidrógeno mediante la formación de esporas.

El tratamiento térmico utilizado consistió en someter a los inóculos a una temperatura de 104°C en una estufa por 24 h. La biomasa seca completamente, se trituro y se homogenizó en tamaño pasándola por una malla del # 20 (850 µm). Se conservó en condiciones libres de humedad a temperatura ambiente hasta su utilización.

4.2.1 Determinación de esporas (Wirtz-Conklin)

Algunos géneros bacterianos, entre ellos los *Clostridium*, producen en su interior formas de resistencia denominadas endoesporas. Se producen cuando las condiciones ambientales son desfavorables formándose una espora por cada forma vegetativa. Al finalizar el proceso de esporogénesis, la célula vegetativa se lisa y libera la espora al exterior.

Cuando el ambiente es favorable, la espora germina generando una nueva forma vegetativa.

La tinción específica de esporas requiere dos colorantes:

- 1.- Verde malaquita: capaz de teñir las esporas en caliente.
- 2.- Safranina: colorante de contraste que tiñe las formas vegetativas.

Las endoesporas, tras la primera tinción, no perderán el colorante en el lavado con agua, y sí lo harán las formas vegetativas, que quedarán teñidas con el segundo colorante.

Para la tinción se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Preparar los frotis bacterianos indicados.
2. Teñir con verde malaquita. Con unas pinzas de madera colocar la muestra encima de la llama del mechero de forma que el colorante humee durante 5 min.
Nota: evitar que la muestra hierva. Añadir más colorante si éste se evapora; es importante que la muestra no se seque.
3. Lavar con abundante agua el exceso de colorante.
4. Teñir con safranina 1 min.
5. Lavar con abundante agua el exceso de colorante.
6. Secar la preparación.
7. Observar la preparación al microscopio.

La realización de esta prueba es importante para verificar que durante el tratamiento térmico realizado al inóculo se logró la esporulación de las bacterias de interés, esto siempre y cuando la fuente de inóculo cuente con este tipo de bacterias.

4.3 Prueba de producción biológica de hidrógeno

La prueba de producción biológica de hidrógeno que se propone en este trabajo de investigación se llevó a cabo en reactores de 300 mL, en cada reactor se agregan 2 g de inóculo pretratado y 120 mL de fase líquida (medio mineral y sustrato). La temperatura se controló en una incubadora con una agitación constante de 150 r.p.m. por medio un agitador orbital. El pH en los reactores se controló con la solución buffer 0.05 M 2-(N-morpholino) ácido monohidratado etanosulfónico (MES; J.T. Baker) (pKa=6.21, rango de control de pH 5.21 a 7.21), para pH menores de 5.2 se utilizó el ácido benzoico 0.01 M (pKa=4.2)

Los reactores se conectaron a un sistema automático de medición de biogás, y los resultados se obtienen mediante el software de dicho sistema. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado y además cada prueba de inóculo se complementó con dos blancos, el primero para medir la respiración endógena y basal de la biomas; el blanco se preparó agregando al reactor el medio mineral y el inóculo pero sin el sustrato. El segundo blanco se usó para tomar en cuenta la posible producción abiótica de biogás, por lo que el reactor solo contuvo la solución de nutrientes, sin inóculo. En paralelo, se implementaron dos

reactores no conectados al sistema para de ellos tomar muestras y seguir el comportamiento de los parámetros (AGV, COT, pH, biogás).

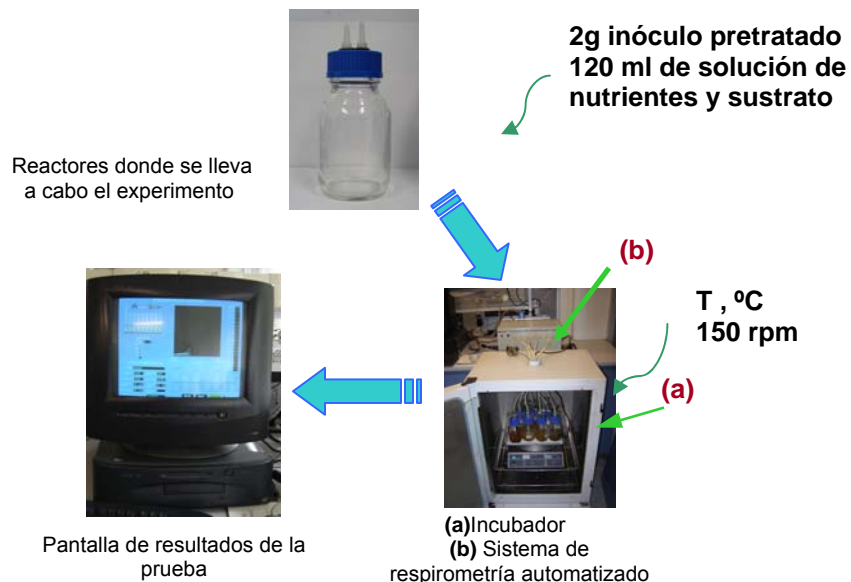


Figura 4.2 Diagrama general de la prueba de producción biológica de hidrógeno.

4.3.1 Medición de biogás

La producción de biogás se midió en un sistema automatizado de medición de biogás, el cual ha sido desarrollado en el Instituto de Ingeniería de la UNAM. Este dispositivo tiene como fin medir la producción de gas en las pruebas de biodegradabilidad anaerobia de aguas residuales. La producción de biogás es medida usando un transductor de presión y un conjunto de válvulas solenoides, el dispositivo cuantifica los incrementos en la presión durante el proceso de degradación, estos incrementos son monitoreados en intervalos regulares. En cada medición, la presión en los reactores se equilibra con la atmosférica, dejando escapar el gas y con esto se evita un incremento de presión por el biogás producido y por consecuencia una posible inhibición de los microorganismos debido a la sobre presión.

El software (programado en Labview) calcula la cantidad de biogás producido usando la ley de los gases ideales, esto con la presión medida y la temperatura a la que se está llevando a cabo la prueba.

La medición de biogás con este sistema permite tener un monitoreo confiable y sencillo de la producción de biogás a través del tiempo y a su vez evita cometer errores mecánicos, metodológicos y humanos durante la medición.

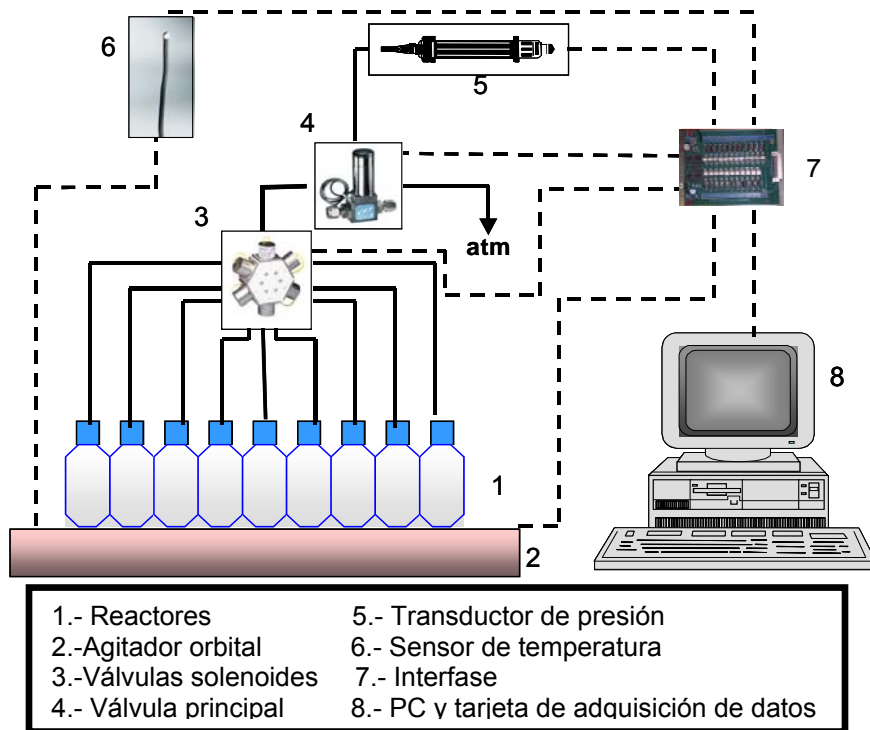


Figura 4.3 Diagrama del sistema automatizado de medición de biogás desarrollado en el instituto de ingeniería de la UNAM.

4.4 Reactor

Se utilizó un reactor de vidrio que operó como un SBR anaerobio (Applikon, con chaqueta de control de temperatura) con capacidad de 6L, un volumen de trabajo de 3L y 1L de volumen de lodos (Figura 4.4). El reactor estuvo conectado a un BioControlador (Applikon ADI 1030 Bio Controller), el cual de acuerdo a la configuración del operador se pueden controlar pH, temperatura, potencial de óxido-reducción, nivel, oxígeno disuelto, además de contar con temporizadores para el funcionamiento de bombas. Para nuestro proceso se controló la temperatura y el pH, se mantuvo constante la agitación y se programaron los tiempos de ciclo (alimentación, reacción, sedimentación y descarga). Al reactor se le adecuó un medidor de flujo másico de biogás con un rango de medición de 0-5 L/h para dar seguimiento a la producción de biogás mediante un software programado en Labview. El biogás fue almacenado en bolsas tipo Tedlar que permitieron un posterior muestreo.



Figura 4.4 Reactor anaerobio SBR

4.5 Técnicas analíticas

4.5.1 Hidrógeno, dióxido de carbono y metano

Para la determinación de la fracción de hidrógeno, dióxido de carbono y metano en el biogás producido, se tomaron muestras de biogás en tubos de 15 mL llenos con una solución saturada de cloruro de sodio acidificada con ácido sulfúrico a pH 2.5 (con el fin de evitar la disolución del CO₂ en el medio). Posterior al muestreo, se tomaron 25 µL de biogás y se analizaron en el cromatógrafo de gases (Agilen Tech. 6890N) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) y una columna capilar Agilent 30m x 0.25 µm x 0.25 µm de fase estacionaria (HP 5 MS 5% fenil metil siloxano) con la técnica previamente establecida para el análisis en dicho equipo. Los datos de área obtenidos fueron cotejados con la curva patrón realizada para cada gas y así poder determinar la composición del biogás.

4.5.2 Ácidos Grasos Volátiles (AGV) y Solventes (Etanol y Acetona)

La determinación de los AGV's y solventes permiten identificar los principales productos del consorcio microbiano de nuestro sistema y poder proponer las posibles rutas metabólicas para la producción de hidrógeno. Para este análisis, se tomó un mL de muestra centrifugada y filtrada y se colocó en un tubo de 1.5 mL con un gota de HCl 1:1 para su conservación. Posterior a ello, las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm por 30 minutos en una micro centrifuga Eppendorf (mod. 5415C), el sobrenadante se filtró y se conservó para su posterior análisis.

Para la determinación de los AGV's y solventes se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilen Tech. 6890N) equipado con un detector de ionización a la flama (FID) y una

columna capilar Agilent 30m x 0.25 μm x 0.25 μm de fase estacionaria (HP 5 MS 5% fenil metil siloxano) en el cual se inyectó 0.2 μL de muestra para ser analizados con la técnica previamente establecida para el análisis en dicho equipo. Los datos de área obtenidos fueron cotejados con la curva patrón realizada para cada reactivo y así poder determinar las ppm de AGV's y de solventes presentes en la muestra.

4.5.3 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Técnica basada en APHA (2005) y manual de espectrofotómetro Hach DR 2002. La demanda química de oxígeno se utiliza como una medida de oxígeno equivalente consumido por las materias oxidables en una muestra que es susceptible a ser oxidada por un agente químico fuerte bajo las condiciones de la prueba. Se utilizaron viales con dicromato potásico y ácido sulfúrico en un rango de 0 – 1500 mg DQO/L. A cada vial se le agregaron 2 mL de la muestra a analizar cuidando de colocar el vial a una inclinación de 45°. Se vierte suavemente por la tapa varias veces para mezclar perfectamente el contenido. Es importante mezclar por completo antes de introducir los viales al reactor HACH para evitar así un calentamiento local en el fondo de la celda y una posible reacción explosiva.

Se colocó el vial dentro del reactor HACH precalentado a una temperatura de 150°C, se efectuó la digestión por 2 horas. Después de las 2 horas se apagó el reactor y se dejaron enfriar por 20 minutos. Se invirtió cada uno de los viales de forma suave mientras estaban aún calientes. Se colocaron en una gradilla de metal y se dejaron enfriar hasta 30–40°C. Por último se leyeron en el espectrofotómetro HACH a 620 nm utilizando el método No. 435. Se utilizó un blanco agregando a un vial 2 mL de agua destilada. El resultado obtenido es en mg DQO/L.

En algunos casos la DQO de la muestra fue demasiada para la capacidad de análisis, suceden este caso se utilizó un vial con un rango mayor (0-15000 mg DQO/L).

4.5.4 Carbono Orgánico Total

El COT se utiliza para detectar la concentración del carbono orgánico en la muestra. Para el análisis se tomó una muestra de 10 mL la cual se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos, se filtró en un filtro de fibra de vidrio (Whatman) y se analizó (Shimadzu 5050). El resultado es de mg COT/L.

4.5.5 Demanda Biológica de Oxígeno (DBO₅)

La DBO₅ Es una estimación de la cantidad de oxígeno que requiere una población microbiana heterogénea para oxidar la materia orgánica de una muestra de agua en un periodo de 5 días. El método se basa en medir el oxígeno consumido por una población microbiana en condiciones en las que se ha inhibido los procesos fotosintéticos de

producción de oxígeno en condiciones que favorecen el desarrollo de los microorganismos. Para la determinación de este parámetro se siguió la técnica descrita en la Norma Mexicana NMX-AA-028-SCFI-2001

4.5.6 Caracterización de los inóculos

Para la caracterización de los inóculos que se emplearon se determinaron los siguientes parámetros: Sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV).

Sólidos suspendidos (Técnica basada en APHA 2005)

Los sólidos totales es la expresión que se aplica a los residuos de material que queda en recipiente y después de la evaporación de una muestra y consecutivo secado en la estufa a temperatura de definida, incluyen los sólidos suspendidos totales o porción de sólidos retenida por un filtro y los sólidos suspendidos fijos, generalmente material inorgánico. Sólidos fijos es la expresión aplicada al residuo de los sólidos suspendidos totales después de someterse a ignición durante un tiempo determinado y a una temperatura específica. La pérdida de peso por ignición corresponde a los sólidos suspendidos volátiles.

A los filtros se les debe eliminar la humedad colocándolos en una estufa a 105°C durante varias horas. Después se pesan (manteniendo su peso constante) y se registra su peso. En un sistema de vacío se coloca el filtro y se hacen pasar 10mL de lodos, se coloca en una laminilla o bandeja de aluminio y se introducen en una estufa a 100°C por una hora. Posteriormente se dejan enfriar y se registra su peso.

Los sólidos suspendidos totales (SST) se determinaron restando la masa del filtro después de la estufa (Fe) y la masa del filtro a peso constante (F) y dividiendo entre el volumen de la muestra (4.a).

$$SST = \left(\frac{F - Fe}{\text{muestra mL}} \right) 1000 = \text{mg/L SST} \quad (4.a)$$

Después de pesar los filtros se introducen a una mufla a una temperatura de 550°C por 15 minutos, después se introducen en la estufa para disminuir su temperatura, después se pasan al desecador durante 15 minutos y finalmente se registra el peso.

Los sólidos suspendidos volátiles son la diferencia entre el peso registrado después de la estufa y después de la mufla y dividiendo entre el volumen de la muestra (4.b), las unidades para expresarlos son los mismos.

$$SSV = \left(\frac{Fe - Fm}{\text{muestra mL}} \right) 1000 = \text{mg/L SSV} \quad (4.b)$$

4.5.7 Nitrógeno amoniacal (N-NH₃) (Método Hach 8038)

El análisis se realizó con el método descrito por en el manual HACH. Se toman 25mL de muestra a la que se le adicionan tres gotas de estabilizador mineral, tres gotas de solución de un agente dispersante (alcohol polivinílico), se agita y posteriormente se le agrega un mililitro del reactivo de *Nessler*, se agita y se deja reaccionar un minuto. Una vez transcurrida la reacción se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 425 nm, con la ayuda de un blanco (de agua destilada) al cual también le fueron agregados los reactivos anteriormente mencionados.

4.5.8 Fenoles

La concentración de fenol fue medida por medio de la técnica colorimétrica usando 4-aminoantipirina. Los compuestos fenólicos reaccionan con la 4-aminoantipirina a un pH de 7.9 +/- 0.1 en presencia de un medio alcalino para formar un complejo de color que va del amarillo al naranja. Para el análisis se toman 25 mL de la muestra, se le agregan 1.25 mL de NH₄OH 0.5 N, 0.5 mL de solución de 4-aminoantipirina y 0.5 mL de Solución de ferrocianuro de potasio, se deja reaccionar por 15 minutos y se lee en un espectrofotómetro a 500 nm, esto después de haber leído un blanco de agua destilada al cual se le agregaron los mismos reactivos.

4.5.9 Sulfatos (Método Hach 8051)

Para la determinación de sulfatos se utilizaron sobres con polvo SulfaVer. Se tomaron 25 mL de la muestra y se le agregó un sobre con polvo SulfaVer. La mezcla se agitó ligeramente, dejando reaccionar por 5 minutos. El reactivo agregado generará turbidez en presencia de sulfatos. Una vez transcurridos los 5 minutos leyó en el espectrofotómetro a 450 nm, esto después de haber leído un blanco de la muestra.

CAPÍTULO 5

Pruebas de producción biológica de hidrógeno: Selección del inóculo, pH y temperatura óptimos

En este capítulo se describen las pruebas de producción biológica de hidrógeno referentes a la selección del inóculo y a la influencia del pH y la temperatura sobre la prueba. Se desarrolla la metodología específica para evaluar cada punto de interés y se discuten los resultados para arrancar el reactor piloto anaerobio descrito en la sección 4.4.

5.1 Introducción

Para evaluar la eficiencia de los bioprocesos durante la producción de biogás, en nuestro caso de hidrógeno, la prueba de producción biológica de hidrógeno fue usada (ver sección 3.1). Para obtener resultados fiables en nuestros experimentos ciertos factores debemos tomar en cuenta y cuidar, entre los que se encuentran la composición del medio, la cantidad de sustrato a degradar, las condiciones a las que se lleva a cabo la prueba (pH, temperatura, agitación, etc.) y el inóculo (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004).

El éxito en la producción de hidrógeno en un bioproceso depende de la cantidad y tipo de bacterias anaerobias presentes en la biomasa; diferentes fuentes de inóculo han sido utilizados en las investigaciones previas, ya sea tomados de digestores anaerobios o incluso de cepas puras como las de *Clostridium sp*. (Fang, et al., 2002; Zhang et al., 2006). La posibilidad de evaluar la capacidad de producción de hidrógeno de distintos inóculos nos permitirá elegir el inóculo que mejor convenga para nuestro bioproceso.

Por otra parte, el determinar las condiciones de operación (pH y temperatura) óptimas para el proceso será un acierto importante en la investigación pues como sabemos durante la generación de hidrógeno por bacterias se llevan a cabo reacciones redox y el pH influye directamente sobre ellas y de igual forma la temperatura tiene una fuerte influencia en la velocidad de reacción, sin embargo al tratarse de procesos biológicos condiciones extremas pueden llegar a inhibir al consorcio microbiano.

El objetivo particular en los experimentos realizados para este capítulo es evaluar cuatro fuentes de inóculo, así como la influencia del pH y la temperatura sobre la producción de hidrógeno.

5.2 Metodología

Para el desarrollo de los experimentos planteados en este capítulo se llevaron a cabo pruebas de producción biológica de hidrógeno descritas en la sección 4.3 bajo la metodología mostrada en la figura 5.1.

5.2.1 Influencia del origen del inóculo

Se estudiaron cuatro fuentes de inóculo: 1) Lodos activados (LA) provenientes de la planta de tratamientos de aguas residuales de Ciudad Universitaria, UNAM, 2) Lodo anaerobio granular (LG) de un reactor anaerobio (UASB) de una cervecera, 3) Estiércol de vaca (EV) y 4) Composta a base de hojarasca (COM).

Cada inóculo se sometió al tratamiento térmico descrito en la sección 4.2 con el fin de inhibir las bacterias metanogénicas (consumidoras de hidrógeno) y seleccionar, si es que existen en el inóculo, a las bacterias formadoras de esporas capaces de producir hidrógeno. Las pruebas de producción biológica de hidrógeno se llevaron a cabo a un pH constante de 6.2 y una temperatura de 26°C.

La fase líquida de los reactores contenía los siguientes nutrientes por cada litro de agua preparada: NH_4Cl , 2600 mg; K_2HPO_4 , 250 mg; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 125 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.5 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2.5 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, mg; H_3BO_4 , mg; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mg; ZnCl_2 , 0.5 mg. La Glucosa fue agregada como donador de electrones en una concentración de 3 g/L.

Se determinaron los sólidos suspendidos de los inóculos para determinar la fracción orgánica en los mismos. De forma simultánea, en los inóculos que mostraron mejores resultados, se realizó una prueba adicional en condiciones anaerobias estrictas para evaluar la influencia de esta condición en la producción de hidrógeno.

Los resultados de este trabajo se muestran como producción neta de hidrógeno, es decir, restando la producción endógena de hidrógeno. Los resultados obtenidos de una curva de producción de hidrógeno en una prueba de producción biológica son:

- 1.- Tiempo de latencia, $TL_{(10)}$ el cual es definido como el tiempo necesario para obtener el 10% de hidrógeno producido.
- 2.- La actividad específica, la cual se calcula por medio de la pendiente máxima de la curva de producción de hidrógeno.
- 3.- El hidrógeno producido o pseudorendimiento (y') el cual se calcula con la ecuación (5.a)

$$y' = \frac{\text{H}_2 \text{ producido (mol)}}{\text{sustrato alimentado (mol)}} \quad (5.a)$$

5.2.2 Influencia del pH y temperatura

Con el inóculo que presentó el mejor resultado en cuanto a producción de hidrógeno (lodo granular anaerobio), se llevaron a cabo los experimentos para determinar la influencia del pH y de la temperatura sobre la prueba de producción biológica de hidrógeno.

Se siguió la misma metodología usada para determinar la influencia del origen del inóculo con la variante de que las pruebas se evaluaron a diferentes pH (4.5, 5.5 y 6.5) y cada una de estas condiciones a diferentes temperaturas (26, 35 y 55 °C).

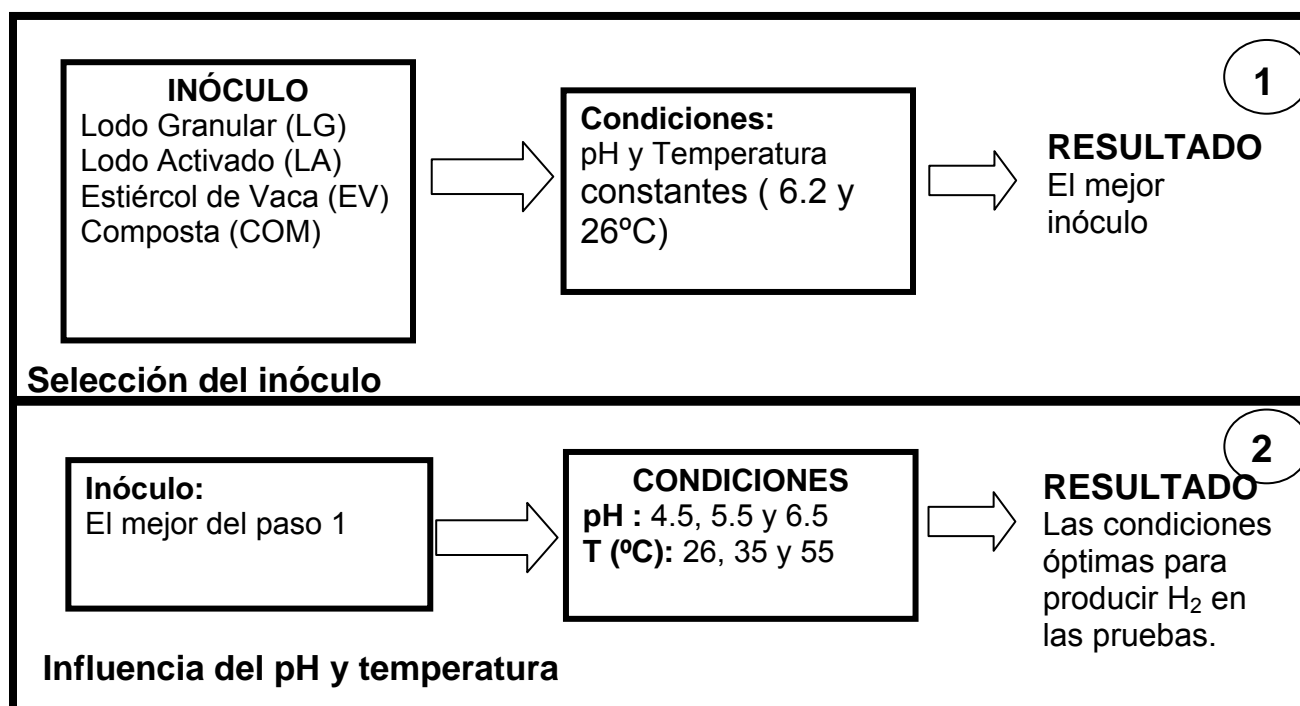


Figura 5.1 Metodología general para determinar la influencia del origen del inóculo, el pH y la temperatura sobre la prueba de producción biológica de hidrógeno.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Caracterización de los inóculos

La Tabla 5.1 muestra la caracterización de los sólidos suspendidos contenidos en los cuatro inóculos que se evaluaron para la prueba de producción biológica de hidrógeno. La cantidad de biomasa base seca que fue utilizada en cada prueba fue la misma (2 g), pero en términos de la fracción de material orgánico se observan marcadas diferencias entre los inóculos, por ejemplo, el estiércol de vaca fue el que presentó la mayor cantidad de materia orgánica.

Tabla 5.1 Caracterización de los inóculos

Inóculo	Fracción de material orgánico SSV/SST
Lodo granular	0.80
Lodo activado	0.78
Estiércol de vaca	0.90
Composta	0.65

5.3.2 Influencia del origen del inóculo en la producción de hidrógeno

Los resultados de la figura 5.2 muestran diferencias importantes entre los inóculos, tal es el caso del tiempo necesario para que empiece la producción de biogás (TL_{10}). Las pruebas con lodo activado (LA) y lodo granular (LG) muestran los mejores resultados, ya que presentan los valores más bajos de TL_{10} de 11 ± 0.07 h y 17 ± 0.05 h, respectivamente, mientras que la Composta (COM) presenta el mayor TL_{10} (31 ± 0.1 h).

Bajo las mismas condiciones experimentales, la producción de hidrógeno así como su desviación estándar fueron diferentes para cada inóculo. Las pruebas con el estiércol de vaca (EV) y el lodo granular (LG) presentaron la mayor producción de biogás con valores de 1.69 ± 0.005 , 1.79 ± 0.20 mmol de hidrógeno, comparados con los resultados del lodo activado (LA) y composta (COM) que fueron de 0.94 ± 0.12 y 1.29 ± 0.08 mmol de hidrógeno. Las réplicas de las pruebas con LA mostraron las más altas desviaciones estándar durante todo el experimento, mientras que las pruebas con LG presentan la menor variabilidad. Esto puede explicarse con base en las diferencias entre estos dos inóculos en términos de la densidad de bacterias productoras de hidrógeno presentes en los inóculos antes del tratamiento térmico.

En este estudio, el inóculo derivado del LG fue con el que se observó la mayor producción de biogás y el que presentó la menor variación entre las replicas. En un estudio sobre la calidad de inóculos sobre la prueba de biodegradabilidad anaerobia realizado por Moreno-Andrade y Buitrón (2004) muestran que en efecto, el LG es el mejor para este tipo de pruebas, además de que presentan una alta cantidad de bacterias facultativas por gramo de SSV. Esto sugiere que en nuestro experimento el LG tiene una alta probabilidad de ser donde se encuentre una mayor cantidad de bacterias formadoras de esporas, las cuales son las óptimas para producción de hidrógeno vía fermentación.

Ese grupo de bacterias fueron seleccionadas durante el tratamiento térmico aplicado a cada inóculo. Además se pudo constatar la existencia de esporas mediante tinciones realizadas a los inóculos, tal como se muestra en la figura 5.2.

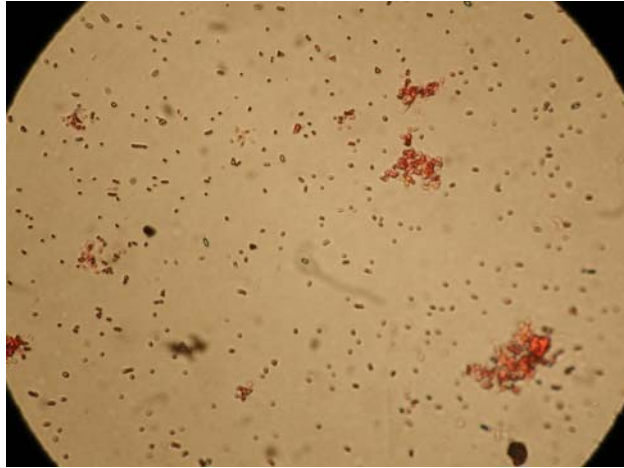


Figura 5.2 Visualización de las esporas formadas a partir del LG durante el pretratamiento

Como observamos el LG y el EV obtuvieron producción de hidrógeno parecidas, por lo que con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza con una $\alpha=0.05$ lo cual indica que no existe diferencia significativa entre los resultados de ambos inóculos. Sin embargo, el LG tiene una menor variación entre las replicas, la cual podría estar relacionada a que presenta un consorcio microbiano más homogéneo, esto como resultado de la operación controlada del reactor anaerobio de la cervecería en cuanto a la composición del influente y de las condiciones de operación. Por estas razones, el LG es el más adecuado (de acuerdo a este estudio), para ser usado como inóculo para arrancar un reactor anaerobio productor de hidrógeno.

Es conocido que el inóculo de EV contiene bacterias fermentativas, pero estas son menos que en el LG (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004) especialmente del genero *Clostridium* sp. (Fan et al., 2004). Esto puede explicar las diferencias en el volumen de biogás producido. En este sentido, otras variables como la “dieta” de las vacas puede inducir a variaciones en la capacidad de EV para ser usado como inóculo para arrancar un reactor para la producción fermentativa de hidrógeno. En el caso de el LA, la reproducibilidad de los datos no es buena en general en todo el experimento, es valido mencionar que el LA era un potencial candidato de inóculo, esto por la facilidad de ser obtenido, ya que la mayoría de las plantas de tratamiento de aguas residuales en México operan bajo este proceso. Es interesante realizar un estudio sobre los pretratamientos (aclimatación) que se le pueden dar a este inóculo para incrementar su capacidad de producción de hidrógeno y así contar con un consorcio microbiano en cantidad y calidad adecuadas para inocular este tipo de procesos.

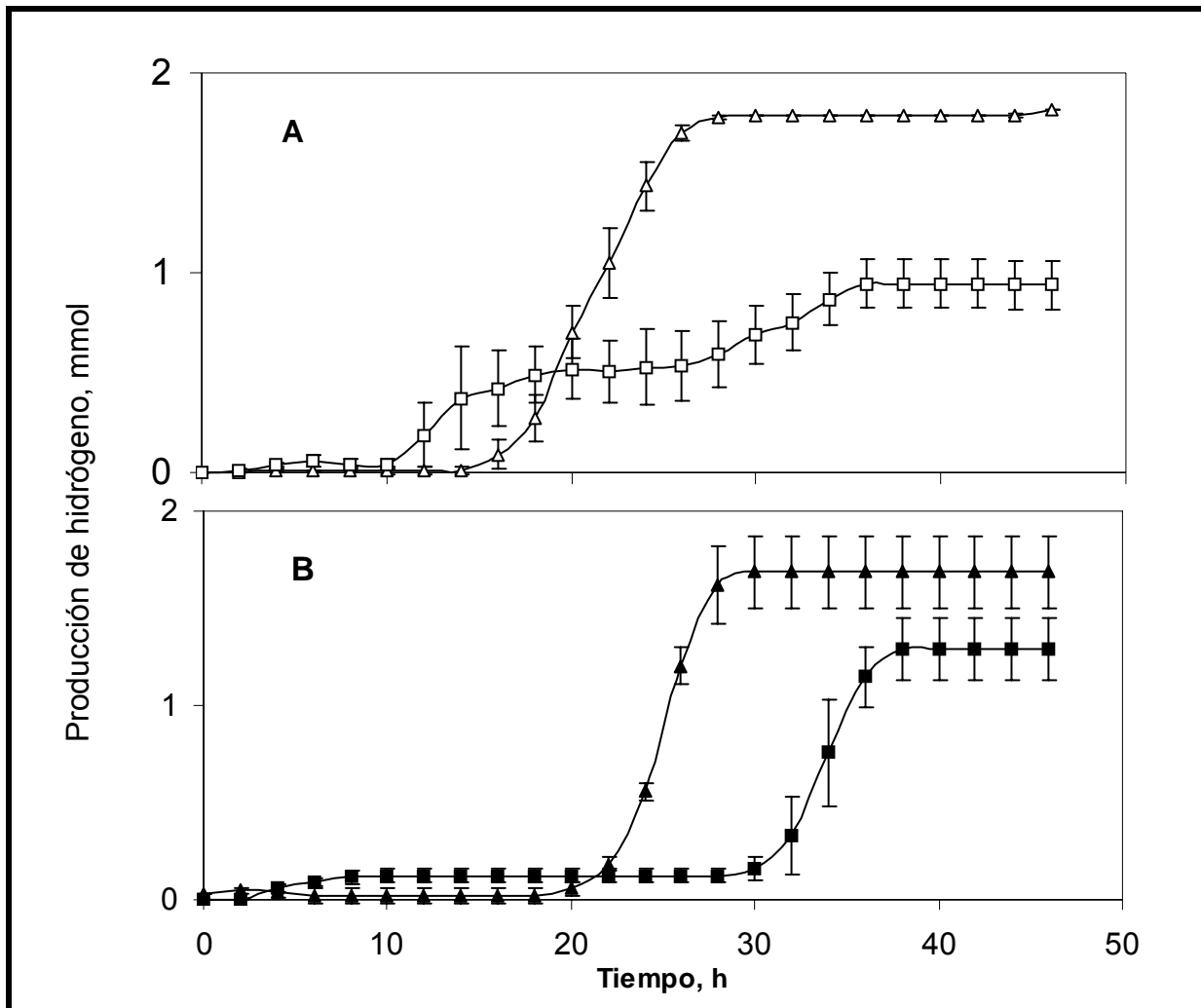


Figura 5.3 Producción de hidrógeno con diferentes inóculos; (A) Lodo Granular \triangle ; Lodo Activado \square ; (B) Estiércol de vaca \blacktriangle ; Composta \blacksquare .

Mizuno, et al. (2002) reportaron el incremento de la producción de hidrógeno con el uso de de nitrógeno en los reactores. Para verificar si el burbujeo de nitrógeno en la fase líquida favorecía al rendimiento de la producción de hidrógeno, una segunda prueba se realizó, solo se utilizando el LG y el EV, bajo la premisa que hasta este punto eran los mejores candidatos como inóculos para esta prueba. Para asegurar las condiciones anaerobias estrictas desde un inicio, la solución mineral con la biomasa se burbujó con nitrógeno (100%) durante 5 minutos antes de empezar la fermentación.

Los resultados en los dos inóculos mostraron que la eliminación de oxígeno con nitrógeno reduce la fase de latencia (TL_{10}) y maximiza tanto la cantidad de biogás producido como la fracción de hidrógeno presente. En general la producción de biogás fue alrededor de 35% más alta en las condiciones anaerobias estrictas. La tabla 5.2 muestra las diferencias entre los inóculos LG y EV en función del tratamiento aplicado. Como se sabe, la producción de hidrógeno a partir de glucosa esta en el intervalo de 2 a 4 mol/mol de glucosa (Hallenbeck, 2005). En general, las condiciones anaerobias estrictas aumentaron las conversiones de 22 al 33% para el LG y 21 al 30% para el EV, además de que redujo la fase Lag_{10} .

Tabla 5.2 Producción de biogás de dos inóculos con y sin condiciones de burbujeo con nitrógeno.

INÓCULO	Con	
	Sin burbujeo	burbujeo inicial
LG		
H ₂ producido(mol/mol de glucosa alimentada)	0.90	1.32
Producción Teórica de H ₂ (mmol)	8	8
Conversión (%)	22	33
TL ₁₀ (h)	17 ± 0.05	12 ± 0.4
Actividad específica (mmol biogás/SSV-h)	0.25	0.50
EV		
H ₂ producido(mol/mol de glucosa alimentada)	0.85	1.20
Producción Teórica de H ₂ (mmol)	8	8
Conversión (%)	21	30
TL ₁₀ (h)	21 ± 0.1	17 ± 0.3
Actividad específica (mmol biogás/SSV-h)	0.37	0.44

Por otro lado Logan et al., (2002), demostraron que el incremento de la presión parcial del hidrógeno en el reactor, debido a su acumulación, inhibe la producción de hidrógeno. De esta manera un mayor índice de producción de hidrógeno se obtenía en las pruebas donde el biogás en los reactores era continuamente purgado respecto a las pruebas donde solo se purgaba periódicamente o en su defecto no se purgaba.

En la prueba de producción biológica de hidrógeno propuesta en esta investigación, el sistema de medición de biogás utilizado cuenta con la opción de poder determinar el intervalo de purga del sistema, para este trabajo se determinó que se purgara cada dos horas con el fin de evitar la inhibición de producción de biogás demostrada por Logan et al. (2002).

5.3.3 Influencia del pH y la temperatura en la producción de hidrógeno

Los experimentos para determinar la influencia del pH y de la temperatura se hicieron con lodo granular anaerobio sometido al tratamiento térmico con base en los resultados del experimento anterior en donde se observó la más alta producción de hidrógeno al utilizar este inóculo. Los resultados obtenidos se encuentran en la figura 5.4. Para las tres temperaturas experimentadas las mayores producciones de hidrógeno se presentaron en el intervalo de pH de 5.5 a 6.5, siendo las máximas producciones de hidrógeno a una temperatura de 26°C con 2.28 y 2.34 mmol H₂ para el pH = 5.5 y 6.5, respectivamente. El biogás producido en las pruebas estaba constituido por hidrógeno (68%) y dióxido de carbono (32%). Cabe subrayar que en ningún caso se detectó metano, indicando que con el tratamiento térmico las bacterias metanogénicas fueron eliminadas.

Con respecto a la influencia de la temperatura, Ueno et al. (2001) reportaron que el rango de 50-60°C es la temperatura óptima para la producción de hidrógeno, contrario a los resultados en este estudio. Estas diferencias podrían explicarse con base en el tipo de inóculo utilizado ya que Ueno et al. (2001) en sus experimentos utilizaron un consorcio

microbiano donde se encontraron especies particularmente termofílicas. Por su parte Valdez-Vazquez et al (2006) encontraron que a una temperatura de incubación de 37°C se obtenía una mayor producción de hidrógeno que a 55°C, esto utilizando mini reactores en lote con residuos sólidos como sustrato y aplicando un pretratamiento térmico al inóculo, indicando que posiblemente estos resultados son debidos a que esta condición de incubación (mesofílica) era la mejor para la germinación de las esporas seleccionadas durante el pretratamiento térmico.

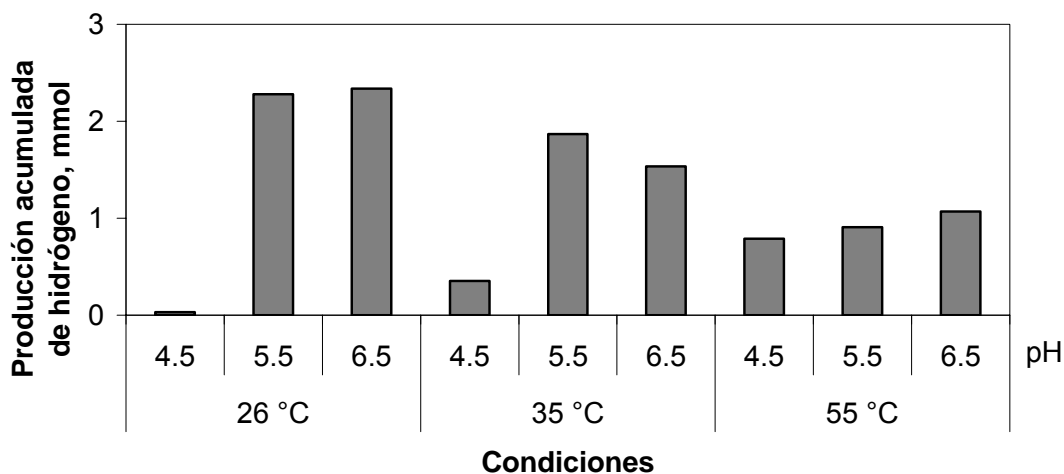


Figura 5.4 Producción de hidrógeno en función del pH y de la temperatura.

La Figura 5.5 muestra el curso de la producción de hidrógeno en función de la temperatura a pH constante de 6.5. Se observa que el tiempo de latencia (TL_{10}) fue de 6 ± 0.5 h, 2 ± 0.7 h y 0 h para las temperaturas de 26, 35 y 55 °C, respectivamente, esto indica que la temperatura tiene una fuerte influencia proporcional sobre la velocidad a la que se lleva a cabo la generación de biogás. Sin embargo, la máxima producción de hidrógeno se observa a 26 °C, esto sugiere que el inóculo se ve inhibido con el aumento de la temperatura.

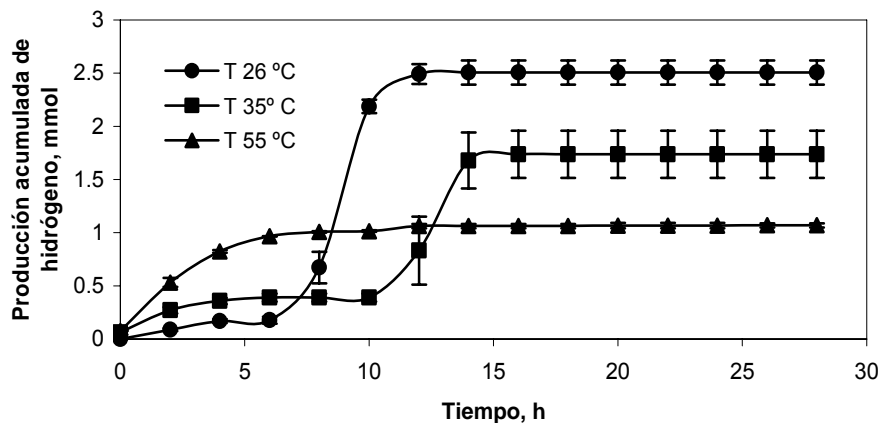


Figura 5.5 Influencia de la temperatura sobre la producción de hidrógeno a pH 6.5

Producción de AGV y solventes

En la Tabla 5.3 se resumen los resultados de los productos generados en la fase líquida durante la prueba. El ácido acético fue en general el principal producto generado, sugiriendo que el proceso se inclina por la fermentación acética. Los ácidos propiónico, butírico e isobutírico en algunos casos también fueron generados pero en bajas concentraciones comparadas con la del acético.

El etanol solo fue detectado en la prueba llevada a cabo a 35°C con un pH de 5.5, la acetona se observó a 26 y 35 °C, pero solo a pH de 5.5 y 6.5. La mayor actividad metabólica se observó a pH de 6.5 y una temperatura de 26°C, indicada por la cantidad de subproductos generados. La ausencia de subproductos a pH de 4.5 sugiere que el sistema se ve inhibido a pH bajos.

Tabla 5.3 Productos del metabolismo de las pruebas de producción de hidrógeno a diferentes condiciones de pH y temperatura.

Temperatura °C	pH	mol H ₂ /mol C ₆ H ₁₂ O ₆	Conversión %	TL ₁₀ h	Ac mg/L	Pr mg/L	i-But mg/L	But mg/L	EtOH mg/L	Acet mg/L
26	4.5	0.02	0.39	15 ± 0.09	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	5.5	1.14	28.52	16 ± 0.8	37.96	ND	29.22	ND	ND	42.17
	6.5	1.17	29.22	6 ± 0.5	1386	41	53.3	119.9	ND	318
35	4.5	0.17	4.22	2 ± 0.06	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	5.5	0.89	22.29	3 ± 0.08	67.2	2.5	31	2.5	2.26	46.18
	6.5	0.73	18.32	2 ± 0.7	37.8	ND	ND	ND	ND	17.2
55	4.5	0.35	8.84	0	11.6	7.8	0	0	0	0
	5.5	0.41	10.17	0	72.15	0	0	0	0	0
	6.5	0.51	11.47	0	97	0	0	139	0	0

Nota. Ac: ácido acético; Prop: ácido propiónico; i-But: ácido isobutírico; But: ácido butírico; EOH: etanol; Acet: acetona. ND: No Detectado

5.4 Conclusiones

Los resultados muestran que el LG es la mejor opción para inocular un reactor productor de hidrógeno, debido a que obtuvo la mayor conversión y producción de biogás comparada con los otros inóculos, además que en comparación con el EV, tiene una mejor reproducibilidad entre las pruebas debido a una menor variabilidad en la composición de su consorcio microbiano. Por otra parte, se demostró la capacidad de los LA para usarse como inóculo en la producción de hidrógeno, lo que también lo hace un inóculo factible y más fácil de obtener.

Se encontró que el mejor intervalo de pH para la producción hidrógeno es de 5.5 a 6.5 y que la mayor producción de hidrógeno (1.17 mol H₂/mol glucosa) se obtuvo a una temperatura de 26°C, por lo que como resultado de esta parte experimental se emplearon estas condiciones para arrancar un reactor productor de hidrógeno.

CAPÍTULO 6

Evaluación del potencial de vinazas de la industria del tequila y de un ingenio azucarero para la producción de hidrógeno.

Uno de los objetivos de esta investigación fue aplicar los resultados a efluentes de aguas residuales, por tal motivo es importante realizar experimentos no solo con agua sintética, sino con efluentes reales para observar la reproducibilidad de los resultados con la realidad; para ello, en este capítulo se evaluó la prueba de producción biológica de hidrógeno usando aguas residuales como fuente de carbono (sustrato), esto con el objetivo de justificar el uso de este tipo de desechos en el bioproceso planteado. Se caracterizaron vinazas de la industria del tequila y vinazas producidas en un ingenio azucarero y se evaluó el potencial de ambas para producir hidrógeno.

6.1 Introducción

Durante los experimentos para la selección del inóculo, así como definir las condiciones de pH y temperaturas óptimas se usó glucosa como un sustrato modelo ya que es fácil de degradar y se conocen los productos de su metabolismo, facilitando la interpretación de los resultados. Sin embargo, no se debe perder de vista que la meta es utilizar este proceso en efluentes reales como las aguas residuales de la agroindustria que muestran un fuerte potencial para la producción de hidrógeno por vía biológica ya que además de producir el energético, el proceso contribuirá al tratamiento de dicho efluente ya que se los metabolitos formados (AGV's) son de fácil degradación en una planta de tratamiento de aguas residuales. Las vinazas son importantes candidatas para la producción de hidrógeno debido a su elevado contenido orgánico el cual causa fuertes problemas ambientales debido a su inadecuada disposición final sin tratamiento. Este es el caso de las vinazas de la industria del tequila y de las vinazas generadas en los ingenios azucareros, por lo que resulta interesante evaluar la viabilidad que tienen ambos efluentes industriales para producir hidrógeno de manera biológica.

6.2 Metodología

Para la evaluación del potencial de producción de hidrógeno a partir de las vinazas, se llevaron a cabo pruebas de producción biológica de hidrógeno (descritas en la sección 4.3), bajo las mejores condiciones de operación de acuerdo a los resultados obtenidos en el capítulo anterior. En la figura 6.1 se muestra la metodología seguida para la realización de los experimentos descritos en este capítulo.

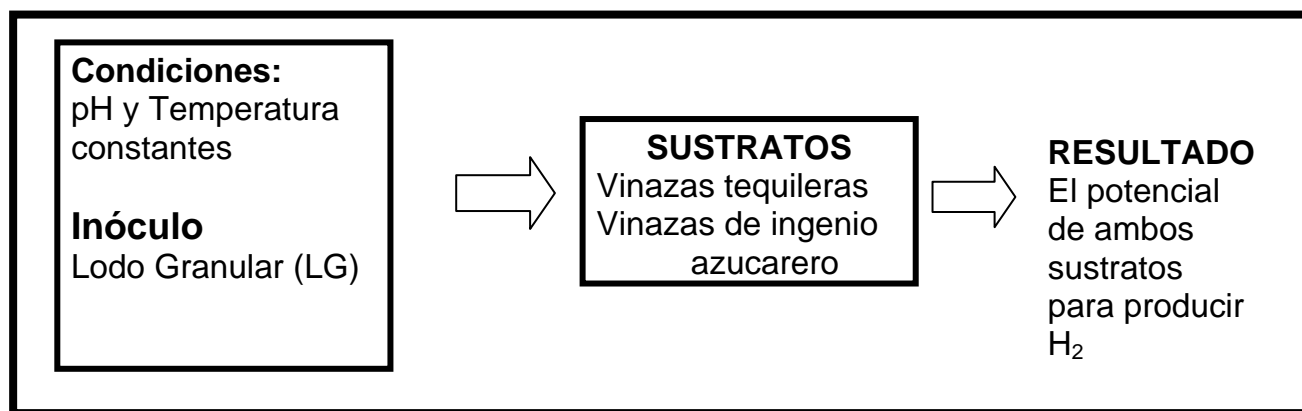


Figura 6.1 Metodología general para determinar el potencial de las vinazas para producir hidrógeno.

6.2.1 Caracterización de las vinazas

Cuando se planea trabajar con un efluente, siendo este de cualquier índole, siempre debe conocerse las características del mismo; con el propósito de conocer un poco a cerca de qué es lo con lo que se va a trabajar. Bajo esta premisa, a las vinazas se les realizó una serie de análisis para conocer su contenido de N-NH₃, fenoles, sulfatos, DQO y DBO, esto con las técnicas analíticas descritas en la sección 4.5.

6.2.2 Evaluación del potencial de producción de hidrógeno

Para evaluar el potencial de las vinazas para producir hidrógeno se realizó la prueba de producción de hidrógeno usando el lodo granular como inóculo, un pH de 6.5 y una temperatura de 26°C. Se utilizó una dilución de vinazas de tal forma que fase líquida de la prueba contara con 3 g DQO/L. Se le agregaron de igual manera la solución mineral mencionada en la sección 4.3 con el fin de que la prueba no se inhibiera por falta de nutrientes.

6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Caracterización de las vinazas

La tabla 6.1 muestra la caracterización de las vinazas donde se observa que la concentración de materia orgánica de ambas vinazas es alta, pues se trata de contenidos de varias decenas de gramos por litro. También se destaca el hecho de que la concentración de los compuestos recalcitrantes (fenoles principalmente) y del nitrógeno amoniacal son mayores en las vinazas del ingenio azucarero lo cual se verá reflejado en la biodegradabilidad de este efluente por el proceso biológico (Jiménez et al, 2006; Bazúa et al. 1991)

Por otra parte, la relación DBO_5/DQO en las vinazas del ingenio es de 0.28 valor que indica una mediana biodegradabilidad, contrario al resultado obtenido en las vinazas de la industria del tequila cuyo valor fue de 0.81 lo que indica una alta capacidad para biodegradarse.

Tabla 6.1 Parámetros importantes de las vinazas tequileras y del ingenio azucarero.

Parámetro	Vinazas tequileras	Vinazas de ingenio azucarero
DBO_5 , mg/L	32500	25100
DQO, mg/L	40 000	99 000
DBO_5/DQO	0.81	0.28
Fenoles, mg/L	14	46
N-NH ₃ , mg/L	300	700
Sulfatos, mg/L	810	6300

Con los resultados obtenidos hasta este punto se puede inferir que las vinazas de la industria del tequila serían más aptas para un proceso biológico pues sus características son menos agresivas comparadas con las del ingenio azucarero. Sin embargo, esta aseveración se tiene que corroborar con las pruebas de producción biológica de hidrógeno.

6.3.2 Evaluación del potencial de producción de hidrógeno

Aun cuando las condiciones en las que se llevo a cabo el experimento y la concentración de DQO/L fueron las mismas para ambas pruebas, se observaron diferencias significativas respecto a la producción de hidrógeno (figura 6.2). Como se observa la vinaza procedente de la industria del tequila tuvo una producción de 1.8 mmol de hidrógeno, mientras que la vinaza procedente del ingenio azucarero solo alcanzo a producir 0.36 mmol, por lo que podemos decir que la vinaza de la industria del tequila cuenta con un mayor potencial para producir hidrógeno durante un tratamiento biológico.

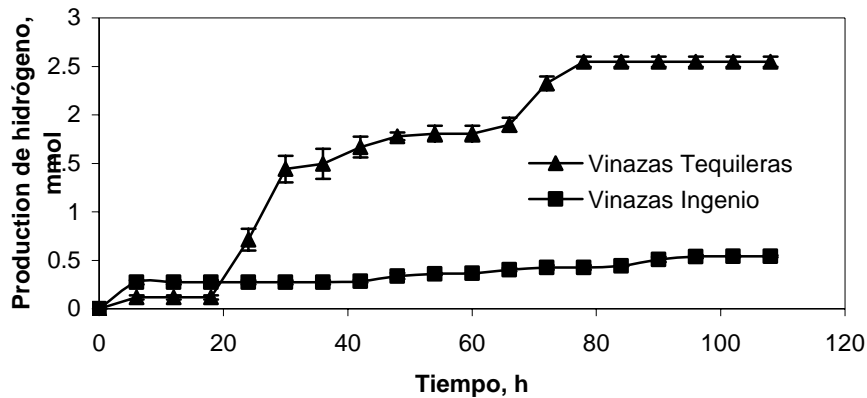


Figura 6.2 Resultado de la prueba de producción biológica de hidrógeno a partir de vinazas tequileras y del ingenio azucarero

Otro resultado interesante es que a las 36 h en el caso de la vinaza tequilera ya se había generado poco más del 50% del total de hidrógeno producido, con una rapidez de producción de hidrógeno de $0.35 \text{ mmol H}_2/\text{g DQO} \cdot \text{d}$, la cual para el caso de la glucosa fue de $0.83 \text{ mmol H}_2/\text{g DQO} \cdot \text{d}$. Ahora bien, cabe destacar que estos resultados son iniciales, el sistema aun no se encontraba especializado, por lo que en un sistema donde se mantenga la biomasa y se este continuamente alimentando se esperaría una aclimatación. Finalmente, los resultados observados indican que si es viable producir hidrógeno a partir de vinazas.

6.4 Conclusiones

La capacidad de las vinazas procedentes de la industria del tequila para ser tratadas por sistemas biológicos, al menos así lo refleja la relación DBO_5/DQO . Por otra parte el potencial para producir hidrógeno que mostró la vinaza tequilera frente a la vinaza del ingenio azucarero deja muy en claro que es viable utilizar la primera como sustrato en un sistema para producir hidrógeno. Por tal motivo, es la vinaza de la industria del tequila el efluente que se eligió en este trabajo para evaluar la aplicación de un sistema biológico productor de hidrógeno y los parámetros operacionales del mismo.

CAPÍTULO 7

Determinación la carga orgánica y del TRH adecuados para la producción de hidrógeno a partir de la biodegradación de vinazas de la industria del tequila

En los capítulos anteriores se determinaron las condiciones en las que se favorecen la producción de hidrógeno, incluso se aplicaron estas condiciones a aguas residuales industriales con alto contenido orgánico y se comprobó la viabilidad de producir hidrógeno a partir de ellas, específicamente de la vinaza procedente de la industria del tequila, finalmente para poder proponer en una primera instancia un sistema biológico productor de hidrógeno es necesario determinar el tiempo de retención hidráulica (TRH) así como la carga orgánica a la que se trabajará. En este capítulo se trata de dar respuesta a estos cuestionamientos, partiendo de que se utilizará un sistema SBR y la vinaza tequilera como sustrato, se realizaron pruebas a tres diferentes concentraciones de vinaza (1, 3 y 5 g DQO/L) usando un TRH de 24h y con la concentración que presentó mayor índice de producción de hidrógeno se realizaron experimentos usando tres diferentes TRH: 18, 24 y 36 h.

7.1 Introducción

Como se ha mencionado un sistema SBR esta conformado de 5 etapas principales: llenado, reacción, sedimentación, decantación y tiempo muerto; el llenado, la sedimentación, decantación y tiempo muerto, se pueden determinar de acuerdo a la velocidad de sedimentación, de las bombas, etcétera. Sin embargo, en lo que respecta al tiempo de reacción, éste tiene que ser el adecuado para que el consorcio microbiano pueda llevar a cabo su metabolismo y genere la máxima producción de biogás a partir del sustrato alimentado, de ahí la importancia de determinar el TRH óptimo.

Por otra parte la carga orgánica, B_v (kg DQO/ m³/día) es una variable importante para nuestro sistema ya que una sobre carga puede llegar a inhibir al proceso por exceso de sustrato o por una excesiva producción de metabolitos (AGV's) a partir del alimento proporcionado al consorcio microbiano.

7.2 Metodología

Para la realización de esta última parte experimental se utilizó el reactor descrito en la sección 4.4 y se seguirá la metodología mostrada en la figura 7.1. El reactor estuvo agitado a 150 r.p.m. y se trabajó bajo las condiciones óptimas de pH y temperatura encontradas en el capítulo 5. Cabe señalar que para cada condición solamente se realizó la prueba por triplicado y se muestra el promedio. Para el alcance de esta tesis no se contempló realizar una prueba de tratabilidad y aclimatar el sistema a cada condición, pues el tiempo de experimentación era limitado.

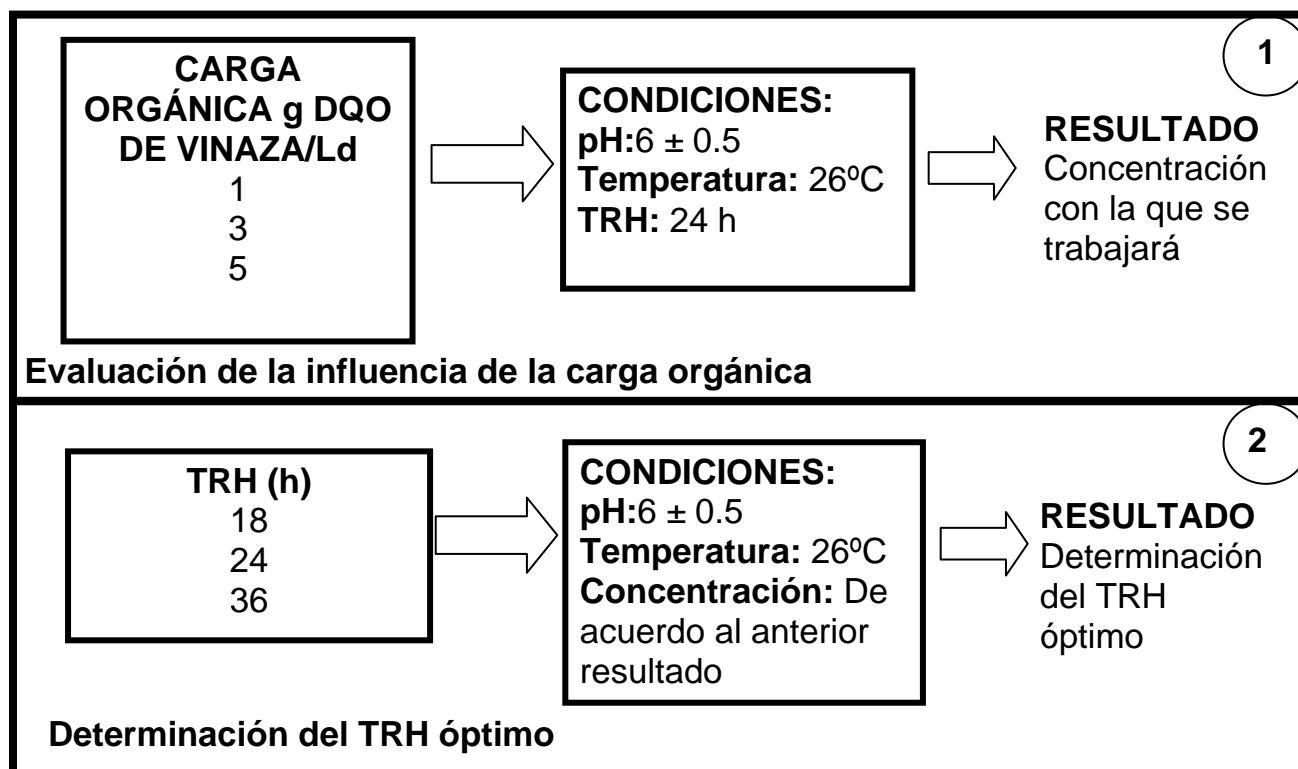


Figura 7.1 Metodología general para determinar la influencia de la carga orgánica y el TRH sobre la producción de hidrógeno en un sistema piloto

7.2.1 Influencia de la carga orgánica sobre la producción de hidrógeno

Para evaluar la influencia de la carga orgánica sobre el sistema, se realizaron pruebas con tres diferentes cargas: 1, 3 y 5 g DQO/L d, teniendo como TRH 24h, el sistema se alimentó con la solución mineral que se usó en las pruebas de producción biológica de hidrógeno para evitar interferencia en los experimentos por falta de nutrientes.

7.2.2 Determinación del TRH en un sistema piloto de laboratorio

Una vez determinada la carga que se utilizará en el sistema (1g DQO/L d) se realizaron pruebas a diferentes TRH: 18, 24 y 36 h, para determinar el TRH más adecuado para la producción de hidrógeno.

7.3 Resultados y discusión

7.3.1 Influencia de la carga orgánica (Bv) sobre la producción de hidrógeno

En la Tabla 7.1 se presentan los resultados del reactor SBR con respecto a la producción de hidrógeno bajo las cargas orgánicas experimentadas y un TRH de 24 h para todos los casos. Como se observa, existieron diferencias importantes en la producción de hidrógeno, siendo la carga de 1 g DQO/L-d con la que se obtuvo la mayor producción de hidrógeno de 2.0 ± 0.32 mmol H₂/g DQO_{alim}, al compararla con 0.6 ± 0.17 y 0.5 ± 0.0 mmol H₂/g DQO_{alim} para las cargas orgánicas de 3 y 5 g DQO/L-d, respectivamente.

La generación de metabolitos (tabla 7.1), como los ácidos grasos y solventes muestra que su concentración fue mayor con las cargas de 3 y 5 g DQO/L-d. Estos resultados junto con la menor producción de hidrógeno (0.6 ± 0.17 y 0.5 ± 0.0 mmol H₂/g DQO_{alim} para ambas cargas, sugieren que la reducida producción de hidrógeno pudo haberse debido a las elevadas concentraciones de los ácidos acético y propiónico. Al respecto, Valdez-Vázquez et al., (2006) reportaron que existe una inhibición bioquímica por acumulación de ácidos orgánicos lo cual puede originar un descenso del pH. La elevada concentración de AGV's pudo ser debido a que el hidrógeno generado fue reutilizado por el sistema para actuar como reductor y generar ácidos, lo que origina una reducción del metabolismo y por lo cual la etapa de generación de solventes se vio limitada.

Es importante destacar que en la carga orgánica de 1.0 g DQO/L-d se observó una menor concentración del ácido acético y propiónico, así como la presencia de solventes, en especial el etanol, que no se obtuvo con las cargas de 3 y 5 g DQO/L-d. Esto sugiere que bajo esta carga orgánica no se presentó la inhibición del proceso y que las condiciones fueron las adecuadas para el proceso de reconversión de los ácidos a solventes.

Tabla 7.1 Productos del metabolismo en el reactor SBR anaerobio para la determinación de la carga orgánica óptima para producir H₂.

Carga orgánica (Bv), g DQO/L d	H ₂ , mmol H ₂ /g DQO _{alim}	Ac mg/L	Pr mg/L	i-But mg/L	But mg/L	EtOH mg/L	Acet mg/L
1	2.0 ± 0.32	194 ± 10	74 ± 15	5 ± 2	14 ± 7	14 ± 13	10 ± 2
3	0.6 ± 0.17	616 ± 70	333 ± 54	ND	37 ± 7	ND	45 ± 20
5	0.5 ± 0.00	615 ± 37	462 ± 38	ND	100 ± 9	ND	27 ± 5

Nota. Ac: ácido acético; Prop: ácido propiónico; i-But: ácido isobutírico; But: ácido butírico; EtOH: etanol; Acet: acetona. ND: No Detectado

Con base en lo anterior, se concluye que una carga orgánica baja es mejor para la producción de hidrógeno ya que existe una mayor utilización de sustrato.

7.3.2 Determinación del TRH en un sistema piloto de laboratorio

Considerando los resultados de la etapa anterior, se utilizó una concentración de vinazas de 1g DQO/L para la determinación del TRH óptimo en la operación del SBR anaerobio.

La tabla 2 de los resultados del efecto de los TRH experimentados muestra que la producción de hidrógeno es prácticamente la misma a un TRH de 18 y 24 h, con 1.56 ± 0.2 y $1.94 \pm$ mmol H₂/g DQO_{alim}, respectivamente. Cuando el TRH se incrementó a 36 h se logró un aumento del 35 % (2.49 ± 0.29 mmol H₂/g DQO_{alim}) en la producción de hidrógeno, en comparación al TRH de 18 h. Por lo anterior, y considerando el incremento en el porcentaje de hidrógeno producido al aumentar de 18 a 36 h de TRH; se considera que el TRH de 18 h es el más apropiado para la operación del reactor SBR para el tratamiento de las vinazas tequileras.

Los resultados de producción de hidrógeno se pueden comparar favorablemente con los obtenidos por Fan et al., (2006) en un reactor anaerobio en continuo de 2 L a un TRH de 18 h y alimentado con agua residual de la industria cervecera. Bajo estas condiciones obtuvieron un rendimiento del 43.1 mL de H₂/g DQO, cercano al obtenido en este estudio de 35 mL H₂/g DQO (condiciones estándar), sobre todo si se considera que el efluente de las cerveceras no contiene los compuestos recalcitrantes presentes en las vinazas tequileras, que eventualmente podrían inhibir la producción de hidrógeno.

Tabla 7.2 Productos del metabolismo en el reactor SBR anaerobio para la determinación del TRH óptimo para producir H₂

TRH, h	Prod. de H ₂ , mmol H ₂ /g DQO _{alim}	Ac mg/L	Pr mg/L	i-But mg/L	But mg/L	EtOH mg/L	Acet mg/L
18	1.56 ± 0.2	151 ± 22	182 ± 4	6 ± 1	37 ± 3	ND	11 ± 2
24	1.94 ± 0.3	156 ± 15	116 ± 21	4 ± 0	32 ± 8	ND	1 ± 0
36	2.49 ± 0.3	124 ± 18	85 ± 15	4 ± 1	25 ± 3	ND	ND

Nota. Ac: ácido acético; Prop: ácido propiónico; i-But: ácido isobutírico; But: ácido butírico; EtOH: etanol; Acet: acetona. ND: No Detectado

Respecto a la generación de metabolitos se observa que es similar en los tres TRH utilizados, presentándose mínima generación de solventes lo que es adecuado para la efectiva producción de hidrógeno.

7.4 Conclusiones

La carga orgánica y el TRH influyen sobre la producción de hidrógeno en un reactor SBR utilizando vinazas tequileras. A cargas orgánicas bajas existe una mayor utilización de sustrato que a cargas orgánicas altas. Respecto al TRH, se encontró que no existen diferencias significativas entre 18 y 24 h. Cuando se utiliza el TRH de 36h, el aumento en la producción de hidrógeno solamente es del 35%. Para optimizar el sistema es deseable llevar a cabo una aclimatación bajo las mejores condiciones encontradas.

CAPÍTULO 8

Resumen de Resultados y Conclusión

Principales Resultados:

En lo que respecta la inóculo, los resultados muestran que el lodo granular es la mejor opción para arrancar un reactor donde se produzca hidrógeno, esto debido a que la conversión y el rendimiento de la producción de biogás es mayor comparado con estiércol de vaca, composta y con los lodos activados como inóculos, estos parámetros pueden ser usados como un indicador cuando se necesite tomar la decisión sobre cual inóculo elegir.

El pretratamiento térmico aplicado a los inóculos aseguró la formación de esporas en los inóculos que presenten las bacterias con esta propiedad.

El burbujeo inicial de nitrógeno a los reactores para asegurar condiciones anaerobias estrictas y evitar inhibición por presencia de oxígeno en el medio, tuvo una influencia positiva sobre la producción de hidrógeno. Sin embargo, la implementación de esta estrategia a un reactor piloto es muy costosa y perjudicaría la factibilidad de implementar un sistema de producción de hidrógeno a un proceso de tratamiento, por lo que se recomienda indagar algunos métodos de aclimatación de la biomasa para optimizar los valores de los parámetros a evaluar.

El llevar a cabo el proceso a pH bajo reduce la capacidad del sistema para producir hidrógeno causando una inhibición en el consorcio microbiano productor de hidrógeno. Se determinó que el intervalo óptimo de pH para llevar a cabo las pruebas de producción biológica de hidrógeno es de 5.5 a 6.5. Sin embargo, al trabajar en el límite inferior se observó una generación de etanol y acetona lo que indica que el proceso tiende a orientarse hacia una ruta metabólica no deseada en el proceso de producción de hidrógeno. Por tal motivo durante el control del proceso se debe tener especial cuidado de no rebasar el límite inferior de pH propuesto.

Por otra parte, la temperatura a la que se llevan a cabo los experimentos afecta significativamente la producción de hidrógeno. Utilizando lodo granular anaerobio como inóculo y glucosa como sustrato, se determinó que las condiciones termofílicas no son adecuadas para el sistema ya que no se observa una producción significativa de hidrógeno.

Se encontró que la producción de hidrógeno fue adecuada en el intervalo de temperatura de 26 a 35°, con conversiones cercanas al 30%. Entre los principales parámetros ligados al efecto de la temperatura sobre este proceso se encuentran los tiempos de latencia (TL10),

los cuales a 35 °C fueron menores comparados con los de 26 °C. Sin embargo, la mayor producción de hidrógeno (1.17 mol H₂/mol glucosa) fue obtenida a 26 °C a un pH de 6.5, bajo estas condiciones también se observó una mayor actividad metabólica relacionada con la producción de ácidos grasos y solventes.

Se evidenció que una carga orgánica baja presentaba los mejores resultados de producción de hidrógeno respecto al sustrato utilizado (1 g DQO/L/d). Para las cargas de 3 y 5 g DQO/L/d se observó acumulación de ácidos grasos volátiles y acetona, lo que sugiere existió una inhibición del consorcio microbiano.

Respecto al TRH, no se encontró una diferencia significativa de producción de hidrógeno entre los tiempos de 18 y 24 h, y a 36h apenas se observó un incremento del 35% por lo que se concluyó que un TRH de 18 h es adecuado para la operación del reactor.

Conclusión:

Cumpliendo con los objetivos de la tesis, se demostró que las vinazas tequileras presentan un importante potencial para producir hidrógeno mediante un proceso biológico porque tienen mayor biodegradabilidad que las vinazas de un ingenio azucarero.

Este trabajo puede servir de base para el desarrollo ulterior de las estrategias de control y optimización para la operación de un reactor secuencial anaerobio productor de hidrógeno.

Los resultados de esta investigación justifican la posibilidad de desarrollar tecnología para producir hidrógeno mediante procesos biológicos a partir de efluentes con alto contenido orgánico.

CAPÍTULO 9

Referencias

- American Public Health Association; American Water Works Association; Water Environment Federation. (1992) Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 18th Ed.; Greenberg, A.E.; Clesceri, A, E.; Eaton, A.D.; American Public Health Association: Washington, D. C.
- Bazúa C., Cabrero M., Poggi H., (1991). Vinasses biological treatment by anaerobic and aerobic processes: Laboratory and pilot-plant Tests *Bioresource Technology* 35 (1991) 87-93
- Bermúdez-Savon R., Hoyos-Hernández J., Rodríguez-Pérez S. (2000) Evaluación de la disminución de la carga contaminante de la vinaza de destilería por tratamiento anaerobio. *Rev. Int. Contam. Amb.* 16(3) 103-107
- Buitrón G y Moreno G. (1997) Influence of So/Xo ratio and medium composition on anaerobic biodegradability test. 52nd Purdue University Industrial Waste Conference Proceedings. pp 125-133.
- Cámara Nacional de la Industria del tequila (2007) Informe estadístico 2006
- Chang J., Lee K., Lin P. (2002). Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy* 27,1167-1174.
- Debabrata Das, T. Nejat Veziroglu (2001) Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26, 13-28
- Droste Ronald L, (1997) Theory and practice of water and wastewater treatment. John Wiley & Sons. pp 622-627
- Fan Y.T., Li, C.L., Lay, J.J., Hou, H.W., Zhang, G.S. (2004) Optimization of initial substrate and pH levels for germination of hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost. *Bioresour. Technol.*, vol. 91, pp. 189-193.
- Fan K., Kan N., and Lay J.J. (2006) Effect of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenesis in CSTR. *Bioresour. Technol.*, vol. 97, pp. 84-89.
- Fang, H.H.P., and Liu, H. (2002) Hydrogen production from wastewater by acidogenic granular sludge. *Water Sci. & Technol.*, vol. 47, n. 1 pp. 153-158.
- Fang, H.H.P., and Liu, H. (2002) Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresour. Technol.*, vol. 82, pp. 87-93.
- Fang, H.H.P., Zhang, T. and Liu, H. (2002) Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 58, pp. 112-118.
- Gong M.L., Ren N.Q., and Xing D.F. (2005) Start-up of bio-hydrogen production reactor seeded with sewage sludge and its microbial community analysis. *Water Sci. & Technol.*, vol. 52, n. 1-2 pp. 115-121.
- Hallenbeck, P.C. (2005) Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Science and Technol*, vol. 52, n. 1-2, pp. 21-29.

- Iñiguez G., Acosta N., Martínez L., Parra J., González O. (2005) Utilización de subproductos de la industria tequilera. Parte 7. Compostaje de bagazo de agave y vinazas tequileras. *Rev. Int. Contam. Amb.* 21(1) 37-50
- Jiménez A., Borja R., Martín A., and Raposo F., (2006). Kinetic analysis of the anaerobic digestion of untreated vinasses and vinasses previously treated with *Penicillium decumbens*. *Journal of Environmental Management* 80 (2006) 303–310
- Jones D. and Woods D. (1986) Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbiological reviews*, American Society for Microbiology, Vol. 50 (4) p. 484-524
- Jorquera O.; Hernández J.; Herrera L. (2001). Producción biofotolítica de hidrógeno. *Rev. Ciencia abierta*. Vol 16
- Lin C.Y. and Lay C.H. (2004). Carbon/nitrogen ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**, 41-45.
- Lay J.J., Tsai C.J., Huang C.C., Chang J.J., Chou C.H., Fan K.S., Chang J.I. and Hsu P.C. (2005) Influence of pH and hydraulic retention time on anaerobes converting beer processing wastes into hydrogen. *Water Sci. & Technol.*, vol. 52, n. 1-2 pp. 123-129.
- Logan Bruce E., Oh Sang –Eun, Kim In S., Van Ginkel Steven (2002) Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 36, pp. 2530-2535.
- Logan Bruce E., Oh Sang –Eun, Kim In S., Van Ginkel Steven (2003) The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 37, pp. 5186-5190.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J., (2004) Brock. Biología de los microorganismos, Prentice Hall Iberia, 10ª ed., Madrid, España.
- Meza A., Briones R., Ilangovan K. (1996) Floculación-coagulación como postratamiento del efluente de un reactor anaerobio que trata vinazas tequileras MEMORIAS AIDIS, XXV Congreso Interamericano, noviembre 4-7, 1(1):121-127.
- Mizuno, O., Dindsdale, R., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., Noike, T. (2000) Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Biores. Technol.*, vol. 73, pp. 59-65.
- Moreno-Andrade I. and Buitrón G. (2004) Influence of the origin of the inoculum on the anaerobic biodegradability test. *Water Scien. and Technol.*, vol. 49, n. 1, pp. 53-59.
- Moreno G. (1999) Influence of S_0/X_0 ratio on anaerobic activity test. *Water Scien. and Technol.*, vol. 40, n. 8, pp. 9-15.
- Mu Y., Wang G., Tu H. (2006) Kinetic modelling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures. *Biores. Technol.*, vol. 97, pp. 1302-1307.
- Noyola Robles A. (1998) Anaerobio vs. aerobio un debate (casi) superado, Biológico vs. Primario avanzado, ¿el nuevo debate? *Ingeniería y Ciencias Ambientales.*, n. 34, pp. 10-14.
- Naike T., Ko I.B., Yokoyama S., Kohno Y. and Li Y.Y. (2005) Continuous hydrogen production from organic waste. *Water Scien. and Technol.*, vol. 52, n. 1-2, pp. 145-151

- Pandiyan T., Durán de Bazúa C., Ilangovan K. and Noyola A. (1999) ^{13}C NMR studies on vinasses effluent treated with iron. *Wat. Res.* Vol. 33, No. 1, pp. 189-195,
- Salazar-Plata M. (2006) Implementación de un sistema automatizado para la determinación de la biodegradabilidad aerobia y anaerobia. Tesis de Maestría en Ingeniería (Ambiental), UNAM, México, D.F.
- Shizas I. and Bagley D.M., (2005) Fermentative hydrogen production in a system using anaerobic digester sludge without heat treatment as a biomass source. *Water Scien. and Technol.*, vol. 52, n. 1-2, pp. 139-144
- Schlegel, H.G. (1988) *Microbiología General*, Ed. Omega, Barcelona.
- Ueno Y, Haruta S, Ishii M and Igarashi Y. (2001). Characterization of a microorganism isolated from effluent of hydrogen fermentation by microflora. *Bioscience and Bioengineering*. **92**(4), 397-400.
- Valdez-Vazquez I., Sparling R., Risbey D., Rinderknecht-Seijas N., Poggi-Varaldo H. (2005). Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastes *Bioresource Technology* 96 (2005) 1907–1913
- Valdez-Vazquez I., Ríos-Leal E., Carmona-Martínez A., Muñoz-Paez K., and Poggi-Varaldo H. (2006). Improvement of biohydrogen production from solid wastes by intermittent venting and gas flushing of batch reactors headspace. *Environmental science & technology* / vol. 40, no. 10
- Valdez-Vazquez and Poggi-Varaldo (2008). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* xxx (2008) xxx–xxx
- Van Ginkel, S., Sung, S., Lay, J.J. (2001) Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentrations. *Environ. Sci. Technol.*, v. 35, pp. 4726-4730.
- Venkata Mohan S., Lalit Babu V., Sarma P.N. (2007) Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresource Technology* xxx (2007) xxx–xxx
- Wang Y., Mu Y., and Yu H. (2007). Comparative performance of two upflow anaerobic biohydrogen-producing reactors seeded with different sludges. *International Journal of Hydrogen Energy* v.32, pp.1086-1094.
- Zhang H., Bruns M. A. and Logan B.E. (2006) Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. *Water Res.*, **40**, 728-734.

<http://www.aah2.org.ar/produccion>.

<http://www.tequilatrade.com/espanol/manufac.php>

ANEXO

1

LISTA DE PUBLICACIONES GENERADAS EN ESTE TRABAJO

En memorias de congresos internacionales

1. **A. Montes-Moncivais**, G. Moreno y G. Buitrón (2006) "Hydrogen production from wastewater: Inoculum selection". Oral presentation. Proceedings: Biomass and Waste to Energy Symposium, 29 november-1 december. Venice, Italy

2. **A. Montes-Moncivais**, G. Moreno and G. Buitrón (2007). Influence of inoculum source, pH and temperature on hydrogen production". Oral presentation. 11th World Congress Anaerobic Digestion Bio-energy for our Future. 23-24/Sept/2007. Brisbane, Australia

Sometidos

3. **A. Montes-Moncivais**, G. Moreno and G. Buitrón (2008). Producción de hidrógeno a partir de vinazas tequileras: Selección del inóculo, pH y temperaturas óptimos. Presentation Oral. XXXI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental AIDIS.12-15/oct/2008. Santiago, Chile.

4. **A. Montes-Moncivais**, G. Moreno and G. Buitrón (2008). Biological hydrogen production from tequila vinasses: influence of hydraulic retention time and organic load in an anaerobic. Oral presentation. 10th Latin American workshop and symposium on anaerobic digestion. 18-19/oct/2008. Isla de Pascua, Chile

En memorias de congresos nacionales

1. **A. Montes-Moncivais**, G. Moreno y G. Buitrón (2007). Selección del inóculo para la producción de hidrógeno. Modalidad cartel. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 25-29 Junio. Morelia, Michoacán

2. **A. Montes-Moncivais**, G. Moreno y G. Buitrón (2008). Biological hydrogen production from tequila industry wastewater. Oral presentation. 1st IWA Mexico National Young Water Professional Conference. 9-11 April. Mexico City, Mexico.