



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
INGENIERÍA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA
PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR
DE LAS AGUAS RESIDUALES

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERÍA

INGENIERÍA AMBIENTAL

P R E S E N T A :

CAROLINA CARVAJAL MONROY

TUTOR:

DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ



Junio 2009

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. ADALBERTO NOYOLA ROBLES
Secretario: Dra. MONICA MERAZ RODRÍGUEZ
Vocal: Dr. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ
1er. Suplente: Dr. VICTOR MANUEL LUNA PABELLO
2do. Suplente: Dra. GEORGINA FERNÁNDEZ VILLAGÓMEZ

Lugar donde se realizó la tesis:

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN PROCESOS AVANZADOS
DE TRATAMIENTO DE AGUAS, UNIDAD ACADÉMICA JURIQUILLA,
INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM

TUTOR DE TESIS:

Dr. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ



Esta investigación fue financiada por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-UNAM) en el marco del proyecto IN101707.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (210163) y del Instituto de Ingeniería UNAM.

*A mi mamá, por toda la admiración que me merece,
por sus palabras de aliento, por estar cerca a pesar de la
distancia, porque a ella le debo todo lo que soy*

A Fredy por el apoyo que siempre me ha brindado

*A mis hermanos Paola y Felipe, porque ante sus ojos todo es
posible, gracias por impulsarme a llegar hasta aquí.*

*A Jimmy Ferrer por construir su vida a mi lado, por
acompañarme en este sueño, por ser una bendición en mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Germán Buitrón Méndez, por su constante colaboración en la dirección de esta tesis de grado, sus acertados comentarios y sus valiosas enseñanzas.

Al Dr. Alejandro Vargas Casillas, por su compromiso con la investigación y los proyectos del LIPATA. Gracias por sus invaluable contribuciones.

A la Dra. Mónica Meráz y el Dr. Víctor Luna Pabello, por sus aportes y conocimiento los cuales permitieron mejorar la calidad de este trabajo.

Al Dr. Víctor Alcaraz González, el Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta, y su grupo de trabajo del CUCEI-Universidad de Guadalajara, por su tiempo, su apoyo y colaboración en la consecución de las aguas residuales de la industria tequilera.

Al Dr. Adalberto Noyola Robles y la Dra. Georgina Fernández, por enriquecer este documento con sus valiosos comentarios y observaciones.

Al Ms en B. Jaime Pérez Trevilla y la Msc Gloria Moreno Rodríguez por toda la colaboración que me brindaron en el laboratorio, sin ustedes este trabajo no tendría los resultados que hoy presenta.

A mis amigos Juan Luis Sandoval, Erik Albarrán y Dorian Prato, por su amistad incondicional, por la maravillosa experiencia de vivir en Mexico y haberlos conocido.

A Nancy Ramírez, Francisco Torner, Gastón Martínez, Jaime González, por su amistad y compañía en Juriquilla y por las largas jornadas en el laboratorio.

A todos los académicos del LIPATA, a la Dra. Maria Elena Raynal y el Dr. Rogelio Valadez Blanco, gracias por sus orientaciones y cuestionamientos que ayudaron a fortalecer los argumentos de esta investigación.

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado para la realización de esta investigación y por darme la oportunidad de estudiar en México.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
OBJETIVOS	11
Objetivo General	11
Objetivos Específicos	11
Capítulo 1 ANTECEDENTES	12
1.1. Digestión anaerobia	12
1.2. Métodos para la producción de hidrógeno	15
1.3. Reacciones de producción y consumo de hidrógeno	16
1.4. Aspectos importantes a considerar en la producción fermentativa de hidrógeno	17
1.4.1. Inóculo	17
1.4.2. Pretratamiento del inóculo	18
1.4.2.1. Métodos de inhibición de bacterias metanogénicas	18
1.4.2.2. Métodos de inhibición de bacterias sulfato – reductoras	20
1.4.3. Aclimatación	21
1.4.4. Requerimientos nutricionales	23
1.4.5. Condiciones de operación	23
1.4.6. Tipos de reactores	25
1.5. Reactor discontinuo secuencial	26
1.6. Efecto de la temperatura en la producción de hidrógeno	27
1.7. Seguridad en el manejo del biogás	30
Capítulo 2 TÉCNICAS ANALÍTICAS Y METODOLOGÍA GENERAL	32
2.1. Planeación experimental	32
2.2. Dispositivo experimental	32
2.3. Técnicas analíticas	33
2.3.1. Demanda química de oxígeno	33
2.3.2. Demanda bioquímica de oxígeno	33
2.3.3. Carbono orgánico total	34
2.3.4. Sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos	34
2.3.5. Determinación fracción mol de H ₂ y CO ₂	34
2.3.6. Ácidos grasos volátiles y solventes	35
2.3.7. Nitrógeno amoniacal (N-NH ₃)	35
2.3.8. Fenoles	36
2.3.9. Sulfatos	36
2.4. Validación de equipos	36
2.5. Análisis estadístico	37
Capítulo 3 INFLUENCIA DEL TIPO DE INÓCULO Y LA TEMPERATURA SOBRE LA PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO	39
3.1. Introducción	39
3.2. Metodología	41
3.3. Montaje experimental	42
3.4. Parámetros operacionales	43

3.4.1. Temperatura	43
3.4.2. Sustrato	44
3.4.3. Fuentes de inóculo	44
3.4.4. Pretratamiento	44
3.4.5. Análisis de la producción de hidrógeno	45
3.4.6. Automatización y control	46
3.5. Resultados y discusión	47
3.5.1. Análisis de carbono orgánico	52
3.6. Conclusiones parciales	54
Capítulo 4 PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO A PARTIR DE AGUAS DE LA INDUSTRIA TEQUILERA EN UN REACTOR SBR	55
4.1. Introducción	55
4.2. Efecto del tiempo de retención hidráulica en la producción de hidrógeno	59
4.2.1. Tiempo de retención hidráulica	59
4.3. Metodología	60
4.4. Parámetros operacionales	62
4.4.1. pH	62
4.4.2. Tasas de crecimiento	62
4.4.3. Temperatura	63
4.4.4. Sustrato	63
4.4.5. Aclimatación	64
4.4.6. Condiciones operacionales	65
4.5. Resultados y discusión	65
4.5.1. Caracterización de las vinazas	65
4.5.2. Reactor SBR a 25°C y TRH de 12 h	66
4.5.2.1. Aclimatación	66
4.5.2.2. Composición del biogás	68
4.5.2.3. Subproductos	69
4.5.3. Reactor SBR a 25°C y TRH de 6 h	72
4.5.4. Reactor SBR a 35°C y TRH de 12 h	73
4.5.4.1. Aclimatación	73
4.5.4.2. Composición del biogás	73
4.5.4.3. Subproductos	74
4.5.5. Reactor SBR a 35°C y TRH de 6 h	76
4.5.5.1. Condiciones operacionales	76
4.5.5.2. Aclimatación	76
4.5.5.3. Composición del biogás	78
4.5.5.4. Subproductos	82
4.5.6. Influencia del TRH sobre la velocidad específica de producción de hidrógeno	84
4.6. Conclusiones parciales	85
Capítulo 5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	87
Capítulo 6 REFERENCIAS	90
Anexos	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Bioconversión de la materia orgánica a metano durante el proceso de digestión anaerobia (Gunjer y Zehnder, 1983)	¡Error! Marcador no definido.2
Figura 1.2. Tratamiento biológico de digestión anaerobia en dos etapas	¡Error! Marcador no definido.5
Figura 3.1. Montaje experimental pruebas de biodegradabilidad anaerobia para la producción de hidrógeno	43
Figura 3.2. Producción de H ₂ en las pruebas de biodegradabilidad anaerobia.	46
Figura 3.3. Sistema Automático para Biodegradabilidad Anaerobia SABiA	47
Figura 3.4. Producción de hidrógeno a diferentes temperaturas a partir del consorcio microbiano MESO1 (Glucosa 3 g/L, Biomasa: 2 g/L)	48
Figura 3.5. Producción de hidrógeno a diferentes temperaturas a partir del consorcio microbiano MESO2 (Glucosa 3 g/L, Biomasa: 2 g/L)	49
Figura 3.6. Producción de hidrógeno a diferentes temperaturas a partir del consorcio microbiano TERMO (Glucosa 3 g/L, Biomasa: 2 g/L)	49
Figura 4.1. Montaje experimental	61
Figura 4.2. Aclimatación a agua de vinazas a 25°C (Concentración: 0.5 a 3 g/L)	67
Figura 4.3. Seguimiento producción de biogás a 25°C, en un reactor SBR a partir de efluentes agroindustriales (Vinaza: 0.5 y 1g/L, TRH 12 h)	68
Figura 4.4. Resultados cromatografía de gases. Reactor SBR a 25°C,TRH 12 h (Fuente de sustrato Glucosa: 0.5 - 1g/L, Vinaza: 0.5 -2g/L)	69
Figura 4.5. Producción de biogás a 35°C, TRH 12 h, a partir de efluentes agroindustriales (Vinaza: 1 - 5 g/L)	73
Figura 4.6. Resultados cromatografía de gases. Reactor SBR a 35°C , TRH 12h. (Fuente de sustrato Vinaza: 5 g/L)	74

Figura 4.7. Producción de biogás a 35°C, TRH 6h (Vinaza: 1 - 5g/L)	77
Figura 4.8. Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno a 35°C, TRH 6h (Vinaza: 1y 5g/L)	78
Figura 4.9. Resultados cromatografía de gases. Reactor SBR a 35°C, TRH: 6 h (Fuente de sustrato Vinaza: 3 - 5 g/L)	79
Figura 4.10. Producción de hidrógeno en función del TRH	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Reacciones de producción y consumo de hidrógeno presentes en los procesos anaerobios	16
Tabla 1.2. Comparación de métodos de pretratamiento para la selección de bacterias productoras de H ₂ a partir de cultivos mixtos de bacterias	20
Tabla 1.3. pH óptimo de operación para la producción de H ₂ a partir de cultivos mixtos de bacterias en condiciones mesofílicas	24
Tabla 1.4. Tipo de reactores usados para la producción fermentativa de H ₂	26
Tabla 1.5. Comparación de la temperatura óptima para la producción de H ₂ en diferentes sistemas	30
Tabla 3.1. Origen de los inóculos	44
Tabla 3.2. Temperatura óptima de producción de H ₂ en relación con la temperatura de origen de los inóculos	51
Tabla 3.3. Efecto de la temperatura sobre el tipo de inóculo utilizado para la producción fermentativa de H ₂	52
Tabla 3.4. Carbono orgánico por tipo de inóculo para la producción fermentativa de H ₂	53
Tabla 3.5. Análisis del carbono orgánico total sin sustrato	53
Tabla 4.1. Experiencias en la producción de hidrógeno a partir de aguas residuales industriales	58
Tabla 4.2. Tasas de crecimiento de las bacterias fermentadoras, metanogénicas y sulfatorreductoras	63
Tabla 4.3. Condiciones operacionales del reactor SBR	65
Tabla 4.4. Caracterización de las vinazas	66
Tabla 4.5. Resultados prueba de carbono orgánico total en el reactor SBR a 25°C	69
Tabla 4.6. Resultados prueba de AGVs; reactor SBR a 25°C, TRH 12 h.	71

Tabla 4.7. Análisis del carbono orgánico total en el reactor SBR a 35°C y TRH de 12 h	75
Tabla 4.8. Prueba de AGVs en reactor SBR a 35°C y TRH de 12 h.	76
Tabla 4.9. Condiciones operacionales del reactor SBR a 35°C con un TRH de 6h	76
Tabla 4.10. Producción de H ₂ a partir de sustratos reales en sistemas continuos, semi-continuos o batch	80
Tabla 4.11. Resultados de la operación del reactor SBR con un TRH de 6 y 12h	81
Tabla 4.12. Análisis del carbono orgánico total en el reactor SBR a 35°C y TRH de 6 h	83
Tabla 4.13. Prueba de AGVs en reactor SBR a 35°C y TRH de 6 h.	83
Tabla 4.14. VEPH en función del TRH	85

ABREVIATURAS

AGV: Ácidos grasos volátiles

CSTR: Reactor continuo de tanque agitado, por sus siglas en inglés.

COT: Carbono orgánico total.

DBO: Demanda bioquímica de oxígeno.

DQO: Demanda química de oxígeno.

DQOa: Demanda química de oxígeno alimentada.

RMH: Rendimiento molar máximo de hidrógeno.

SBR: Reactor discontinuo secuencial, por sus siglas en inglés..

SSV: Sólidos suspendidos volátiles.

SSF: Sólidos suspendidos fijos

SST: Sólidos suspendidos totales

TRH: Tiempo de retención hidráulica.

TRS: Tiempo de retención de sólidos.

UASB: Reactor anaerobio de flujo ascendente, por sus siglas en inglés.

VVPH: Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno.

VEPH: Velocidad específica de producción de hidrógeno.

RESUMEN

Efecto de la temperatura en la producción de hidrógeno a partir de las aguas residuales

Palabras clave: Biohidrógeno, temperatura, vinazas

Las aguas residuales de la industria tequilera conocidas como vinazas, se consideran aguas complejas por su elevada concentración de materia orgánica, la diversidad de sustancias que la forman, su alta temperatura en la descarga y su pH ácido. A pesar de su complejidad, estas aguas pueden ser utilizadas para producir energía contrarrestando los efectos ambientales que trae su mala disposición. El hidrógeno constituye una fuente de energía alternativa, con múltiples ventajas, tiene un alto poder calorífico (contiene 2.75 veces más energía que los hidrocarburos) y como producto de su combustión solo se genera agua. La temperatura es un factor muy importante en el rendimiento de la producción de hidrógeno. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la temperatura en la producción de hidrógeno a partir de aguas residuales. Se estudiaron dos sustratos glucosa y aguas residuales de la industria tequilera. Se realizaron pruebas de actividad anaerobia en lote, en reactores de 300 mL. Se comparó la producción de hidrógeno de tres inóculos anaerobios, a cinco temperaturas (25, 35, 45, 55 y 65°C.) utilizando glucosa como sustrato fácilmente biodegradable. Los inóculos fueron pretratados térmicamente, a 104°C por 24h seleccionando las bacterias esporuladas productoras de hidrógeno. Se encontró que no existe una diferencia significativa en la producción de hidrógeno, en condiciones mesofílicas y termofílicas. El rendimiento molar máximo de producción de hidrógeno alcanzado fue de 2.15 ± 1 molH₂/mol de glucosa alimentada, en condiciones mesofílicas y termofílicas. A continuación, se realizó el montaje a nivel de laboratorio de un reactor SBR con el fin de evaluar la producción de hidrógeno a partir de la degradación de las vinazas, se trabajó a 25 y 35°C, con un pH de 5.5 y un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 6 y 12 h. Las mejores condiciones fueron a obtenidas a 35°C, pH de 5.5, TRH de 6h, obteniendo una fracción máxima de H₂ en el biogás de 40% (intervalo promedio de 19 a 33%), velocidad específica de producción de H₂ de 12.38 mL H₂/gSSV-h y una velocidad volumétrica de producción de H₂ de 58 mL/ L-h, siendo muy buenos resultados teniendo en cuenta que las vinazas son aguas inhibitorias que contienen compuestos tóxicos para los microorganismos.

INTRODUCCIÓN

La preocupación internacional frente a la fuerte dependencia de combustibles fósiles y su posible escasez, ha impulsado la búsqueda de nuevas fuentes de energía alternativa renovable a bajos costos que constituyan una solución viable y a corto plazo de este inevitable problema. Por otra parte, la necesidad de disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero, cuyos efectos en el clima y consecuencias ya se hacen evidentes en el mundo, ha despertado un compromiso de todos los países de promover la construcción de tecnologías amigables con el medio ambiente que no contribuyan al aumento de dichas emisiones. En este sentido, son muchas las investigaciones que se han orientado a evaluar la factibilidad de obtener energía a partir de la degradación de compuestos orgánicos, que si bien han logrado buenos avances, son tan solo un abrebocas a lo que falta por explorar

El hidrógeno constituye una fuente de energía alternativa, con múltiples ventajas. Tiene un alto poder calorífico ($C_p = 120 \text{ MJ/kg}$, el valor energético de un kg de hidrógeno es equivalente al de 2.4 kg de metano), contiene 2.75 veces más energía que los hidrocarburos, es transportable y como producto de su combustión sólo se genera agua. La producción de biohidrógeno utiliza a los microorganismos para la degradación de compuestos orgánicos (disponibles en residuos orgánicos, líquidos o sólidos, independientemente de su fuente), a través de los cuales se logra obtener el hidrógeno, en una etapa intermedia de la digestión anaerobia, destacando otra ventaja del proceso, la valoración de los residuos sólidos y líquidos, generando un mercado más atractivo para su tratamiento y correcta disposición.

En tal sentido, y con el fin de contrarrestar los efectos que trae la emisión de CO_2 a la atmósfera y a su vez contribuir en la búsqueda de fuentes alternativas de energía renovables, se realiza el presente trabajo, el cual tiene como objetivo establecer las condiciones óptimas para una producción estable y eficiente de hidrógeno a partir de

las aguas residuales industriales en un reactor discontinuo secuencial (SBR, por sus siglas en inglés), a nivel de laboratorio.

En este trabajo se evaluará la producción de hidrógeno, desde la selección de un inóculo en condiciones mesofílicas y termofílicas, se trabajará con aguas residuales de la industria tequilera, en un intervalo de cinco temperaturas, a partir de las cuales se establecerán las condiciones óptimas de operación para la producción fermentativa de hidrógeno en un reactor SBR, que a la fecha no ha sido trabajado por ninguna otra investigación.

El documento está organizado en seis capítulos, el primero enmarca los fundamentos teóricos de la digestión anaerobia, la producción biológica de hidrógeno y una recopilación de investigaciones recientes que evalúan la temperatura óptima, para la producción hidrógeno. El segundo capítulo describe la metodología general y equipos utilizados en este estudio, el tercero expone los fundamentos, metodología, resultados y conclusiones parciales de las pruebas de actividad anaerobia para la producción fermentativa de hidrógeno. El cuarto capítulo desarrolla la producción de hidrógeno a partir de las aguas de la industria tequilera en un reactor SBR, en condiciones mesofílicas evaluando el efecto del tiempo de retención hidráulica. En el capítulo cinco se dan a conocer las conclusiones y resultados más representativos de este trabajo de investigación.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de la temperatura sobre la producción de hidrógeno a partir de aguas residuales en un reactor discontinuo secuencial SBR, a nivel laboratorio.

Objetivos Específicos

- ✓ Seleccionar el inóculo que presente los mejores resultados en la producción de hidrógeno.
- ✓ Evaluar la producción de hidrógeno en condiciones mesofílicas y termofílicas.
- ✓ Identificar la temperatura óptima y las condiciones relevantes de operación en un reactor discontinuo secuencial SBR, para una producción estable y eficiente de hidrógeno.
- ✓ Implementar las técnicas analíticas y el montaje de un reactor discontinuo secuencial SBR a nivel laboratorio.
- ✓ Evaluar la producción de hidrógeno utilizando aguas residuales de la industria tequilera.

Capítulo 1

ANTECEDENTES

1.1. Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso biológico efectivo para convertir las moléculas orgánicas complejas a dióxido de carbono y metano; se lleva a cabo en ausencia del oxígeno disuelto. Esta consiste en cuatro pasos principales, con la intervención de grupos microbianos totalmente diferentes: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (véase fig. 1.1), los cuales se describen a continuación:

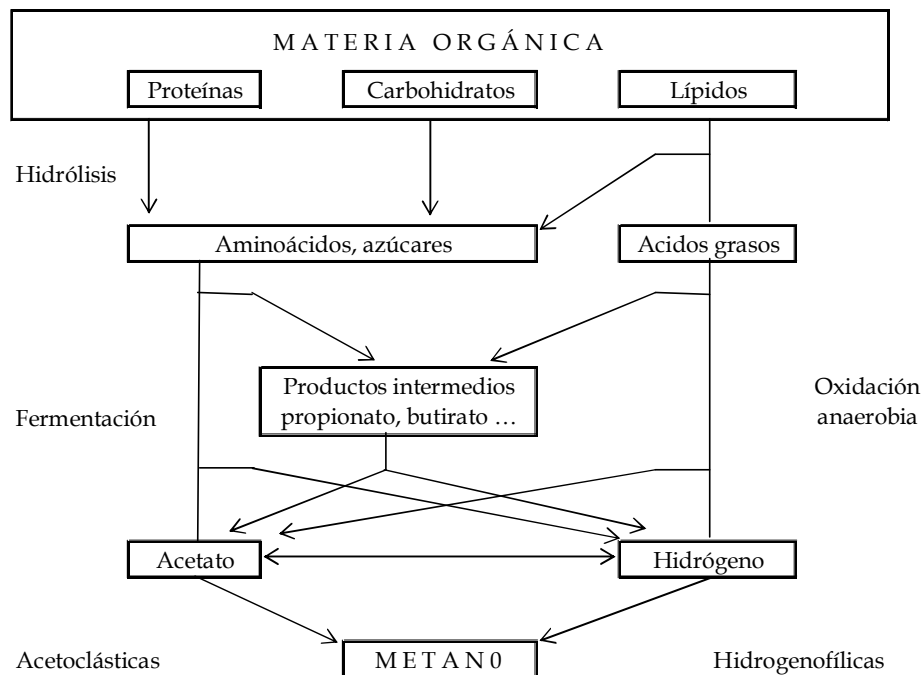


Figura 1.1 Bioconversión de la materia orgánica a metano durante el proceso de digestión anaerobia (Gunjer y Zehnder, 1983)

Primera Etapa: Hidrólisis y Acidogénesis

En esta etapa, las bacterias fermentativas (anaerobias facultativas o estrictas) se ocupan de la hidrólisis de los polímeros orgánicos y de los lípidos para formar elementos estructurales básicos como los monosacáridos, los aminoácidos, ácidos grasos, alcoholes y posteriormente ácidos grasos volátiles de cadena corta, así como hidrógeno y dióxido de carbono.

Segunda Etapa: Acetogénesis

En esta etapa, los productos intermedios de la fermentación mencionados anteriormente, son convertidos a acetato, hidrógeno y dióxido de carbono por bacterias denominadas «bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno» (OHPA, por sus siglas en inglés). La particularidad de estas bacterias, es que son inhibidas por el hidrógeno que producen, por lo que es necesario que éste no se acumule en el medio. Debido a esto, las bacterias OHPA mantienen una estrecha relación con las bacterias que remueven hidrógeno, como las metanogénicas hidrogenofílas.

Las bacterias hidrogenofílas son las encargadas de mantener extremadamente baja la presión parcial del hidrógeno en el sistema, de otra manera los ácidos grasos volátiles, tales como el propiónico, se acumularían en el sistema disminuyendo el pH del medio, lo que inhibiría a las bacterias productoras de hidrógeno.

En esta etapa puede surgir competencia por sustrato frente a las bacterias metanogénicas. Las bacterias homoacetogénicas son capaces de transformar una mezcla H_2 , CO_2 y algunos sacáridos tales como glucosa y fructuosa en acetato únicamente.

Tercera Etapa: Metanogénesis

En esta etapa los microorganismos convierten el hidrógeno y el ácido acético originado por las bacterias formadoras de ácidos, en metano y dióxido de carbono en ausencia de energía luminosa o aceptores de electrones exógenos (O_2 , NO_2^- , SO_4^{2-}). Las bacterias responsables de este proceso son anaerobias estrictas y se les conoce como «metanogénicas» o «formadoras de metano».

Las bacterias metanogénicas se pueden dividir en dos subgrupos dependiendo del sustrato que emplean para producir metano en bacterias acetoclásticas y bacterias metanogénicas hidrogenófilas. Las primeras tienen como función producir metano a partir del ácido acético, normalmente alteran el pH del medio debido a la eliminación de ácido acético y la producción de CO_2 que al disolverse forma una solución amortiguadora de bicarbonato.

Las bacterias metanogénicas hidrogenófilas utilizan el hidrógeno producido en la oxidación anaerobia para reducir el CO_2 a CH_4 , teniendo doble función en el proceso de digestión anaerobia, por un lado la producción de metano y por el otro eliminar el H_2 gaseoso. Esta eliminación actúa sobre el potencial redox de la fermentación y permite a las bacterias acetogénicas regenerar el nicotinamida-adenina dinucleótido (NADH^+) lo que les permite continuar la síntesis de acético.

El sistema de tratamiento biológico propuesto en literatura para el aprovechamiento de la producción de hidrógeno que se muestra en el esquema, (ver fig. 1.2) divide la digestión anaerobia en dos fases, en la primera se combinan las etapas de hidrólisis-acidogénesis y en la segunda la metanogénesis. En el primer reactor, las bacterias anaerobias (*Enterobacter*, *Bacillus* y *Clostridium*) usan los carbohidratos como sustrato para la producción de H_2 , los subproductos generados pasan a un segundo reactor de digestión anaerobia y son degradados por bacterias metanogénicas. Dado que el tiempo de retención hidráulica (TRH) para la producción de H_2 es alrededor de cinco veces menos que el de la producción del metano, el volumen del reactor para la producción de metano es de dos a ocho veces más grande que el volumen del reactor para la producción de hidrógeno de acuerdo con el sustrato que se desee degradar.

Ahora es claro que sin dejar de lado el tratamiento de las aguas, la producción de hidrógeno no busca disminuir la materia orgánica, simplemente la transforma en ácidos orgánicos fácilmente degradados por los microorganismos que deberán ser tratados posteriormente en un sistema de digestión anaerobia.

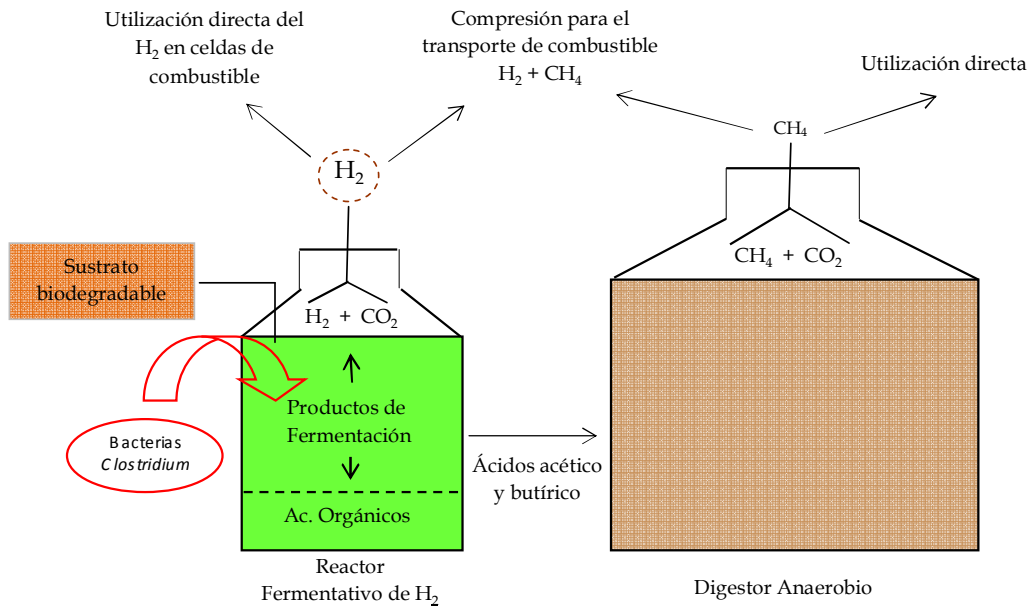


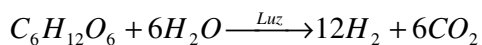
Figura 1.2 Tratamiento biológico de digestión anaerobia en dos etapas

1.2. Métodos para la producción de hidrógeno

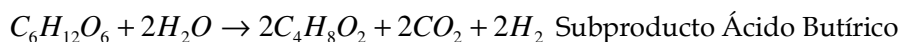
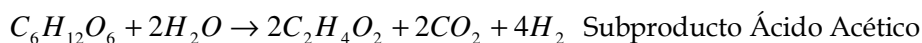
El hidrógeno puede ser producido químicamente, electroquímicamente, como subproducto de procesamiento de aceite / carbón o por el uso de microorganismos (Valdez-Vázquez *et al.*, 2005).

La producción biológica de hidrógeno puede ser clasificada en dos procesos:

a. Fotofermentación: En este proceso se utilizan algas fotosintéticas o bacterias púrpuras no sulfurosas, las cuales producen hidrógeno usando luz y compuestos reducidos, como ácidos orgánicos, que muchas veces están contenidos en sustancias de desecho.



b. Fermentación oscura: La producción de hidrógeno por este método está dada por bacterias anaerobias que crecen en oscuridad y usan sustratos ricos en carbohidratos. Los subproductos de la fermentación lo constituyen los ácidos acético y butírico.



Comparando la producci\u00f3n de hidr\u00f3geno por bacterias fotosint\u00e9ticas o algas y los procesos de fermentaci\u00f3n oscura para producci\u00f3n de hidr\u00f3geno con cultivos anaerobios acidog\u00e9nicos, este \u00faltimo tiene ventajas debido a las altas tasas de producci\u00f3n. Adem\u00e1s, las bacterias oscuras fermentadoras utilizan la materia org\u00e1nica como sustrato y por tanto, tienen la ventaja de convertir los desechos org\u00e1nicos en una fuente de energ\u00eda.

1.3. Reacciones de producci\u00f3n y consumo de hidr\u00f3geno

En la tabla 1.1 se describen las reacciones de producci\u00f3n y consumo de hidr\u00f3geno presente en los procesos anaerobios, con su respectiva energ\u00eda libre de Gibbs, con base en la cual se puede observar que las reacciones de producci\u00f3n de hidr\u00f3geno se dan de manera espont\u00e1nea y natural, obteniendo como subproductos la formaci\u00f3n de \u00e1cido but\u00edrico y acetato, y el consumo de hidr\u00f3geno por bacterias sulfatorreductoras, acetog\u00e9nicas y metanog\u00e9nicas.

Tabla 1.1 Reacciones de producci\u00f3n y consumo de hidr\u00f3geno presentes en los procesos anaerobios

	Reacci\u00f3n	Tipo de reacci\u00f3n	Energ\u00eda Libre de Gibbs ΔG (KJ/reacci\u00f3n)
Producci\u00f3n de H_2	$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow 2H_2 + \text{butirato} + 2HCO_3^- + 3H^+$	Fermentaci\u00f3n	-135
	$C_6H_{12}O_6 + 4H_2O \rightarrow 4H_2 + \text{acetato} + 2HCO_3^- + 4H^+$	Fermentaci\u00f3n	-207
	$\text{Butirato} + 2H_2O \rightarrow 2H_2 + \text{acetato} + H^+$	Oxidaci\u00f3n Anaerobia (sintropia)	48.2
	$\text{Propionato} + 3H_2O \rightarrow 3H_2 + \text{acetato} + HCO_3^- + 3H^+$	Oxidaci\u00f3n Anaerobia (sintropia)	76.2
Consumo de H_2	$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	Metanogenesis	-135.6
	$4H_2 + 2HCO_3^- + H^+ \rightarrow \text{acetato} + 4H_2O$	Acetogenesis a partir de CO_2 e H_2	-104.6
	$4H_2 + SO_4^{2-} \rightarrow HS^- + 3H_2O + OH^-$	Sulfato reducci\u00f3n	-151.9

Fuente: Valdez- V\u00e1zquez *et al.*, 2008

En la mayor\u00eda de los ambientes anaerobios, el consumo de H_2 se lleva a cabo de manera natural muy r\u00e1pidamente por los diferentes grupos microbianos (bacterias metanog\u00e9nicas, acetog\u00e9nicas y sulfatorreductoras) (Valdez- V\u00e1zquez *et al.*, 2008). Sin

embargo, en un sistema productor de hidrógeno lo que se busca es lograr la acumulación de H₂, y para ello debe evitarse que existan concentraciones de nitratos y sulfatos en el influente, ya que en la medida en que estos compuestos se incorporen, la eficiencia del sistema disminuye debido a que asumen la función de aceptores finales de la cadena de electrones.

1.4. Aspectos importantes a considerar en la producción fermentativa de hidrógeno

1.4.1. Inóculo

El biohidrógeno (aquel obtenido con procesos biológicos) puede ser producido por cultivos puros o cultivos mixtos de bacterias. Muchos organismos anaerobios pueden producir hidrógeno en ausencia de la luz, a partir de los carbohidratos contenidos en los residuos orgánicos (Kapdan y Kargi, 2006). Los organismos pertenecientes al *Clostridium*, estrictamente anaerobios y formadores de esporas, han sido ampliamente estudiados para la producción fermentativa de hidrógeno, con muy buenos resultados. Algunas de las especies puras estudiadas son *C. butyricum* (Yokoi *et al.*, 2001); *C. thermolacticum* (Collet *et al.*, 2004); *C. pasteurianum* (Liu y Shen, 2004; Lin y Lay., 2004; Evvyernine *et al.*, 2001); así mismo, se han realizado algunos estudios con organismos facultativos anaerobios del género *Enterobacter*, *E.coli* y *Citrobacter* (Nakashimada *et al.*, 2002; Yokoi *et al.*, 1998; Tanisho *et al.*, 1994; Fabiano y Perego, 2002; Kumar y Das, 2000).

Por otra parte, los cultivos mixtos utilizados para la producción de hidrógeno, provienen de diferentes fuentes, suelo, sedimentos, composta, lodos aerobios y anaerobios. Estos son sometidos a diferentes pretratamientos con el fin de seleccionar a las bacterias productoras de hidrógeno, alterando la comunidad microbiana presente en la población inicial mixta (Cheong y Hasen, 2006). Las especies *Clostridium*, formadoras de esporas son seleccionadas de los ambientes naturales por tratamiento térmico o sometidas a bajos pHs. Cuando los cultivos mixtos son utilizados como inóculo las especies predominantes en el reactor dependen de las condiciones de operación como temperatura, pH, sustrato, tipo de inóculo, pretratamiento del inóculo, presión parcial de hidrógeno, entre otros. En los últimos años, varias investigaciones se han llevado a

cabo para identificar la comunidad microbiana presente en los cultivos mixtos usados para la producción de hidrógeno (Ueno *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2002c; Kawagoshi *et al.*, 2005; Kin *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2008). Fang *et al.*, (2002c), identificaron las especies microbianas en un lodo granular para la producción de hidrógeno a partir de sacarosa. Ellos encontraron que el 69.1% de los microorganismos eran especies *Clostridium* y 13.5% eran especies *Bacillus* y *Staphylococcus*. Así mismo, Koskinen *et al.* (2007), estudiaron la dinámica de la comunidad microbiana presente en un reactor de lecho fluidizado (FBR, por sus siglas en inglés). Ellos encontraron que el rápido crecimiento de la especie *Clostridium butyricum* en el FBR estaba relacionado con la alta producción de hidrógeno y la producción de butirato. Cadenas de *Escherichia Coli* también fueron detectadas a altas tasas de carga de glucosa.

1.4.2. Pretratamiento del inóculo

Con el fin de seleccionar las bacterias productoras de hidrógeno y establecer comunidades de alta eficiencia a partir de los cultivos microbianos mixtos, el inóculo debe ser pretratado antes de ser utilizado en la producción fermentativa de hidrógeno. Para tal efecto, se han desarrollado varios métodos basados en la capacidad que tienen las bacterias productoras de hidrógeno, principalmente las *Clostridium*, de formar esporas ante las condiciones ambientales extremas (bajos pHs y altas temperaturas) disminuyendo o inhibiendo el crecimiento de las bacterias metanogénicas y sulfatorreductoras, los cuales se describen a continuación:

1.4.2.1. Métodos de inhibición de bacterias metanogénicas

Los métodos de pretratamiento reportados para seleccionar a las bacterias productoras de hidrógeno, incluyen principalmente choque térmico, ácido, base, aireación, cloroformo, entre otros (Wang y Wan, 2008). Adicionalmente, existen otros tipos de inhibidores metanogénicos que consiste en la aplicación de condiciones ambientales rigurosas a las que comúnmente son tolerantes las bacterias productoras de hidrógeno (Kawagoshi *et al.*, 2005), como pHs bajos, inferiores a 6, (Cheong y Hansen, 2006) y bajos tiempos de retención hidráulica en un rango de 4 a 17 h dependiendo del sustrato utilizado.

Wang y Wan, (2008) aplicaron diferentes tipos de pretratamiento en lodos digeridos para evaluar y comparar su idoneidad en la selección de bacterias productoras de hidrógeno. Los resultados experimentales mostraron mejores resultados en el inóculo pretratado por choque térmico (hervido a 100°C por 15 min) obteniendo una máxima producción de hidrógeno de 221.5 mL/g de glucosa a 35°C y un pH inicial de 7.0.

Así mismo, Nan-Qi *et al.*, (2008) evaluaron cuatro métodos de pretratamiento (ácido, alcalinidad, aireación y por choque térmico) aplicado a un cultivo mixto de bacterias colectado de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales. Los resultados mostraron que el pretratamiento con ácido, aireación y choque térmico fueron efectivos para eliminar completamente la actividad metanogénica, a diferencia del pretratamiento alcalino. El máximo rendimiento molar alcanzado fue de 1.96 mol/mol de glucosa usando la aireación como pretratamiento, mientras que el más bajo rendimiento se obtuvo con el inóculo acidificado. Los autores concluyeron que los métodos de pretratamiento dan lugar a la diferencia en las primeras comunidades microbianas que pueden ser las directamente responsables de los diferentes tipos de fermentación y los rendimientos molares de hidrógeno.

A pesar de los buenos resultados obtenidos con el pretratamiento por choque térmico, en algunos casos, este método no es efectivo en la selección de bacterias productoras de hidrógeno porque algunas bacterias consumidoras de hidrógeno, como las productoras de ácido láctico y ácido propiónico podrían sobrevivir. En la tabla 1.2 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en investigaciones recientes que evidencian un claro desacuerdo sobre el método de tratamiento óptimo para la selección de bacterias productoras de H₂. De acuerdo con Wang y Wan, (2009) la razón de ese desacuerdo está relacionado con el tipo de inóculo, el método de pretratamiento, las condiciones específicas de cada pretratamiento y la clase de sustrato.

Tabla 1.2 Comparación de métodos de pretratamiento para la selección de bacterias productoras de H₂ a partir de cultivos mixtos de bacterias

Origen del inóculo	Pretratamiento estudiado	Sustrato	Rendimiento molar máximo (RMY)	Pretratamiento óptimo	Referencia
Digestor de lodos	Ácido, base, choque térmico, aireación y cloroformo	Glucosa	1.8 mo/mol glucosa	Choque térmico	Wang y Wan, 2008
Digestor de lodos tratamiedo de aguas residuales	Choque térmico, aireación, ácido, base, 2bromoetanosulfonato ácido y iodopropano	Sacarosa	6.12 mol/mol sacarosa	Base	Zhu y Beleand, 2006
Lodo anaerobio	Sodio 2bromoetanosulfonato, ácido, choque térmico y sus cuatro combinaciones	Agua residual de lacteos	0.0317 mmol/gDQO	Sodio 2bromoetanosufonato	Mohan <i>et al.</i> , 2008
Lodo anaerobio	Ácido, base y choque térmico	Glucosa	2 mol/mol-glucosa	Choque térmico	Mu <i>et al.</i> , 2007
Estiércol de ganado	Congelación y descongelación, ácido, choque térmico, sodio 2bromoetanosulfonato	Glucosa	1.0 mo/mol glucosa	Ácido	Cheong y Hansen, 2006
Gránulos metanogénicos	Ácido, choque térmico y cloroformo	Glucosa	1.2 mo/mol glucosa	Cloroformo	Hu y Chen, 2007

Fuente: Wang y Wan, 2009

1.4.2.2. Métodos de inhibición de bacterias sulfato - reductoras

Algunas investigaciones han reportado que las bacterias sulfato reductoras pueden competir con las bacterias productoras de metano y mantener una interacción sintrófica, de beneficio mutuo, con las bacterias acetogénicas por los productos intermedios en la digestión anaerobia, como el hidrógeno y el formiato (Yu *et al.*, 2002). La presencia del sulfato puede causar varios problemas en los procesos de tratamiento anaerobio, por las siguientes razones:

1. El sulfato es reducido a sulfuro de hidrógeno, el cual es un fuerte inhibidor de los procesos anaerobios.
2. El sulfuro es maloliente y ejerce una alta demanda de oxígeno.
3. El sulfuro de hidrógeno liberado en el biogás causa corrosión.
4. Las bacterias sulfato- reductoras poseen la enzima hidrogenasa, por lo tanto, pueden usar fácilmente el hidrógeno como donador de electrones. Además, compiten por el sustrato con otros microorganismos como las bacterias productoras de metano.

Los iones sulfato se encuentran en algunos residuos producidos por la industria de la pulpa de papel, procesamiento de alimentos del mar y la fermentación de la industria de alcohol (Nan-Qi *et al.* 2008). Estos residuos contienen una gran cantidad de materia orgánica útil para la producción de hidrógeno; sin embargo, las altas concentraciones de sulfato afectan negativamente la generación de hidrógeno por el cambio de la ruta metabólica de fermentación de butirato a etanol (Chiu-Yue y Hong-Pin, 2005).

Al respecto, Chin-Chao et al., (2008) evaluaron la producción fermentativa de hidrógeno a partir de sacarosa (20 gDQO/L) con altas concentraciones de sulfatos (3 g SO_4^{2-} /L) usando un cultivo mixto de bacterias pretratado a 35°C, TRH (2-10 h) pH: 5.5. Los resultados experimentales indican que la producción de hidrógeno no es inhibida en virtud de la alta concentración de sulfato, su eficiencia depende del TRH. Con un TRH corto (4h) se observó un aumento en la producción de hidrógeno de manera eficiente, obteniendo un máximo rendimiento molar de H_2 de 4.70 mol H_2 /mol sacarosa, una máxima velocidad volumétrica de producción de hidrógeno de 874 mmol H_2 /L-d y una máxima velocidad específica de producción de hidrógeno 432 mmol H_2 /g VSS-d. Estos valores fueron considerablemente superiores a los obtenidos para un TRH de 12 h en la misma concentración de sulfato. Los autores concluyeron que un cuidadoso control del TRH es importante para obtener una eficiente producción de hidrógeno.

1.4.3. Aclimatación

Se define como la adaptación de los microorganismos a la degradación de los sustratos específicos o sustancias tóxicas. La selección y distribución de los microorganismos son influenciados por la naturaleza de los sustratos, la magnitud de la variación de la tasa de crecimiento, el tiempo al que los microorganismos están expuestos a condiciones de abundancia y ayuno, y los subproductos generados en el sistema (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004).

La duración de la aclimatación se ve afectada por varios factores ambientales principalmente por la temperatura, el pH, la concentración de macronutrientes y la composición del compuesto que está siendo metabolizado (Moreno - Andrade y Buitrón, 2004).

Gadhamshetty *et al.*, (2009) lograron obtener un consorcio de bacterias capaces de producir H_2 a pHs bajos, en un rango de 3.3 a 4.3, dos unidades por debajo del rango reportado en literatura para los organismos productores de hidrógeno. Se permitió la acumulación del biogás hasta llegar a tres atmósferas de presión, equivalente a un pH de 3.0 en el sistema. El efecto en la aclimatación fue positivo en la producción de H_2 a

bajos pH. Se obtuvo una composición de hidrógeno en el biogás entre 50 y 60%, y una eficiencia de conversión de 43% comparable con la obtenida en otros sistemas de buffer.

Por su parte Dong-Hoon *et al.*, (2009) estudiaron la inhibición por el aumento de la concentración de sodio en la producción fermentativa de hidrógeno. Un reactor continuo completamente agitado fue alimentado con bajo contenido de sodio en una concentración de 0.27 g/L durante 70 días (Fase I), y luego sometidos a mayores concentraciones de Na, 2.41 g Na⁺/L (Fase II), 5.46 g Na⁺/L (Fase III), y 10.14 g Na⁺/L (Fase IV). Se tomaron muestras de biomasa para un ensayo de toxicidad aguda de sodio. A diferencia de la biomasa de control que mostró una disminución monotónica de la velocidad específica de producción de hidrógeno (VEPH) con el aumento de concentración de sodio de 0.27 a 21 g/L, la aclimatación de la biomasa hizo que se mantuviera su actividad a una concentración por encima de 6 g Na/L. Cuando a la biomasa se le permitió contar con tiempo suficiente para adaptarse a la condición de toxicidad crónica de Na, la velocidad volumétrica de producción de H₂ (VVPH) se mantuvo por encima de 4.05 L H₂/L-d hasta la fase III. Una caída de la producción de H₂ irrecuperable se observó en la Fase IV con un aumento notorio de la producción de lactato (representa el 65,6% del total ácidos orgánicos) y propionato. A partir de la literatura se conoce que la producción de butirato esta acompaña de la producción de H₂, mientras que la producción de lactato esta relacionada con reacciones no hidrogénicas.

1.4.4. Requerimientos nutricionales

Se debe tener cuidado con los requerimientos de nutrientes inorgánicos para una producción óptima de hidrógeno a partir de las aguas residuales industriales y sustratos que contienen carbohidratos. Así como el nitrógeno y el fósforo son muy importantes en la producción de hidrógeno, el azufre y el hierro son componentes esenciales en la enzima hidrogenasa, la cual es la encargada de generar el hidrógeno. Se ha visto también que la limitación de hierro en el medio promueve la formación de metabolitos no asociados al metabolismo del hidrógeno, obteniéndose menor producción. A pesar de que existe una amplia variedad de nutrientes utilizados para

la producción fermentativa de hidrógeno, el N, P, K, Mg y Fe son comunes en las soluciones minerales reportadas en la literatura (Hawkes *et al.*, 2007). Sin embargo, dada la variedad de sustratos y concentraciones, se deben determinar las cantidades necesarias de nutrientes inorgánicos y de otros elementos traza, de tal forma que los niveles presentes no lleguen a ser limitantes para lograr una eficiente producción de hidrógeno.

1.4.5. Condiciones de operación

Dentro de los parámetros y condiciones de operación que pueden afectar la producción de hidrógeno se encuentran el pH, el TRH, la presión parcial de hidrógeno, la temperatura, la agitación, la concentración inicial de sustrato, la edad del lodo y el volumen del inóculo. Estos parámetros determinan la eficiencia en la producción de hidrógeno, el contenido de hidrógeno en el biogás, el tipo de ácidos producidos y la velocidad específica de producción de hidrógeno. A continuación se describen algunos de estos parámetros:

Presión parcial de hidrógeno: En algunos casos, la actividad metabólica de la enzima hidrogenasa puede ser reprimida en presencia de altos niveles de hidrógeno. Una reducción en la presión parcial de hidrógeno podría favorecer su producción y permitir a la bacteria metabolizar el acetyl coenzima A (Acetyl CoA), a través del uso eficiente de la energía que conduce a la formación de acetato y la producción de ATP. Mizuno *et al.*, (2000), demostraron que al disminuir el hidrógeno disuelto, por aspersion con N₂, se incrementó la producción de hidrógeno el 68% en, a partir de un consorcio microbiano mixto con 10 g/L de glucosa y sales minerales, pH de 6.5 y TRH de 8.5h.

Agitación: Es un parámetro muy importante a través del cual se consigue la remoción del gas, la mezcla homogénea del nuevo sustrato y la población bacteriana, evita la formación de costras en la superficie y la sedimentación. También son eliminados los gradientes de temperatura y concentración de sustancias en el reactor, previene además la formación de espacios muertos en el digestor y mantiene uniforme la densidad poblacional de microorganismos en el mismo.

Lay (2000), estudió el incremento en la rapidez de la agitación en un reactor continuo a escala de laboratorio (de 100 a 700 rpm) obteniendo con el aumento de la agitación más que el doble de la tasa diaria de la producción de H₂ usando almidón como fuente de carbono.

pH: Es otro factor importante que influye en la actividad de las bacterias productoras de H₂ porque este puede afectar la actividad de la hidrogenasa, así como la vía metabólica.

En la tabla 1.3 se muestran los resultados de estudios realizados en los cuales se evidencia que los pH bajos, inferiores a 6, favorecen la producción de H₂, a partir de un cultivo mixto de bacterias pretratado, usando diferentes tipos de sustrato.

Tabla 1.3 pH óptimo de operación para la producción de H₂ a partir de cultivos mixtos de bacterias en condiciones mesofílicas

Rango pH estudiado	pH óptimo	Inóculo	Substrato	TRH (h)	Temperatura (°C)	Rendimiento molar máximo (mol H ₂ /mol hexosa)	Referencias
4.0-6.0	5.2	Lodos anaerobios (tratamiento térmico)	Almidón	17	37	2.15	Lay, 2000
4.0-7.0	5.5	Lodos productor de hidrógeno	Glucosa	6	36	2.1	Fang y Liu, 2002
5.7 y 6.4	5.7	Lodos anaerobios de aguas residuales	Glucosa	6	35	1.7	Lin y Chang, 1999
5.0-6.5	5.5	Estiércol de vaca	Residuos de cervecería	18	37	4.3ml/gDQO ₅ *	Fan and Lay, 2006
5.0-6.5	5.8	Comp. de pasto (tratamiento térmico)	Residuos de levadura (cerveza)	32	40	NA	Lay <i>et al.</i> , 2005
4.5-6.0	5.5	Suelo (tratamiento térmico)	Glucosa	10	30	2.5	Van Ginkel y Logan, 2005

Fuente: Hawkes *et al.*, 2007. NA: No aplicable

1.4.6. Tipos de reactores

En la tabla 1.4 se muestra la configuración de biorreactores utilizados para la producción de fermentativa de hidrógeno, destacándose el uso del reactor continuo de tanque agitado (CSTR, por sus siglas en inglés). No obstante, es importante aclarar que a nivel de laboratorio muchas investigaciones se han realizado en reactores en lote debido a su facilidad de operación y control.

En la producción de hidrógeno, los reactores deben retener las bacterias productoras de hidrógeno para obtener una mayor capacidad catalítica y soportar grandes tasas de

carga orgánica. En comparación con los sistemas en suspensión, la mayoría de los sistemas con inmovilización de células productoras de hidrógeno han mostraron eficacia superior, incluso cuando se opera con bajos TRH. Los sistemas en suspensión, han reportado una concentración de biomasa entre 0.8-2.9 g / L, mientras que los sistemas con inmovilización de células son capaces de retener concentraciones de biomasa entre 15,8-32,5 g / L. En tal sentido, se han desarrollado varias alternativas para inmovilizar las bacterias a través de la formación de gránulos de biopelícula o gel de biopartículas (Wu *et al.*, 2006; Shu-Yii *et al.*, 2008;). Los principales sistemas de lecho empacado con biomasa inmovilizada utilizados para la producción fermentativa de H₂, son el reactor anaerobio de lecho ascendente (UASB, por sus siglas en inglés), a pesar de que técnicamente la biomasa no se encuentra inmovilizada actúa como tal, y el reactor de lodo granular de lecho inducido (CIGSB¹, por sus siglas en inglés) (Wolfrum y Weaver, 2000; Lin y Chang, 2004; Lee *et al.*, 2004; Gavala *et al.*, 2006).

Lalit *et al.*, (2009) estudiaron la influencia de la configuración del reactor sobre la producción fermentativa de hidrógeno, comparando un reactor de biopelícula con un reactor de crecimiento suspendido, usando agua residual sintética, a un pH de 6.0, 28°C y un TRH de 24h. Los autores observaron que el reactor de biopelícula presentó una mayor eficiencia (28.98 mmol H₂/d; 1.25 kg DQO/m³-d) que la obtenida en el reactor de crecimiento suspendido (20.93 mmol H₂/d; 1.08 kg DQO/m³-d).

Tabla 1.4 Tipo de reactores usados para la producción fermentativa de H₂

¹ El reactor de lodo granular inducido CIGSB es un biorreactor basado en la configuración del reactor continuo de tanque agitado (CSTR), con un soporte de carbón activado, capaz de incrementar significativamente el consorcio microbiano productores de H₂, aumentando la eficiencia en la producción de hidrógeno

Inóculo	Sustrato	Tipo de reactor	Rendimiento molar máximo (RMH)	Referencia
Lodos aguas residuales	Fructuosa	CSTR	1.68 mol/mol hexosa	Lee <i>et al.</i> , 2007
Lodo anaerobio	Almidón	CSTR	1.5 mol/mol hexosa	Lin <i>et al.</i> , 2008
Lodo anaerobio	Glucosa	CSTR	1.95 mol/mol glucosa	Zhang <i>et al.</i> , 2006
Lodo anaerobio	Glucosa	CSTR	1.63 mol/mol glucosa	Wu <i>et al.</i> , 2008
Lodo residual	Sacarosa	UASB	3.6 mol/mol sacarosa	Chang <i>et al.</i> , 2004
Lodo de digestión anaerobia	Glucosa	Reactor de lecho fluidizado con biopelícula anaerobia	1.7 mol/mol sacarosa	Zhang <i>et al.</i> , 2008
Lodo de digestión anaerobia	Glucosa	Reactor de lecho fluidizado con gránulo anaerobia	1.6 mol/mol sacarosa	Zhang <i>et al.</i> , 2008
Lodos aguas residuales	Sacarosa	CIGSB	3.3 mol/mol sacarosa	Lee <i>et al.</i> , 2004
Lodos aguas residuales	Sacarosa	Biorreactor empacado	3.9 mol/mol sacarosa	Lee <i>et al.</i> , 2003
Lodos aguas residuales	Glucosa	Biorreactor de membrana	1.72 mol/mol hexosa	Lee <i>et al.</i> , 2007
Combinación lodos de digestión e industria farmacéutica	Melaza de refinera de azucar de remolacha	Reactor de cama granular de lodos expandidos (EGSB)	3.47 mol/mol sacarosa	Wan - Qian <i>et al.</i> , 2008
Microflora termofílica	Efluente de aceite de palma	Reactor discontinuo secuencias SBR	3.6 mol/mol hexosa	Sompong <i>et al.</i> , 2007
lodos acidogénicos, mesofílicos y termofílicos	Residuos de alimentos generados en un comedor	Reactor por lotes	1.8 mol/mol hexosa	Shin <i>et al.</i> , 2004
Cultivo mixto	Residuos vegetales de cocina	Reactor por lotes	0.49 mmol/g DQO	Lee <i>et al.</i> , 2008

1.5. Reactor discontinuo secuencial

Son reactores en los que el agua residual se mezcla con un lodo biológico en un medio aerobio o anaerobio. El proceso combina en un mismo tanque las cinco fases en las que opera: llenado, reacción, sedimentación, vaciado y tiempo muerto.

Adicionalmente, los sistemas SBR han mostrado ser una excelente alternativa para el tratamiento de aguas residuales que contienen altas concentraciones de compuestos xenobióticos (Buitrón *et al.*, 2003), para tratar efluentes inhibitorios muy variables y compuestos específicos presentes en las aguas residuales industriales (Torrijos *et al.*, 2004). Adicionalmente el empleo de reactores SBR ha demostrado ser un medio eficiente costo-efectivo y de energía para degradar compuestos orgánicos (Buitrón *et al.*, 2006).

Al comparar los sistemas discontinuos SBR frente a los procesos continuos se evidencian las siguientes ventajas: en los procesos discontinuos se establecen

comunidades con actividad degradadora alta y estable; son flexibles en su operación, tal que se puede actuar rápidamente al existir aumentos puntuales en la concentración de compuestos tóxicos, se puede manipular el tiempo de duración de las fases para aumentarlo o reducirlo dependiendo de la velocidad a la que se está realizando la degradación; el empleo de un único tanque reduce considerablemente la inversión necesaria, 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 (Buitrón *et al.*, 2006).

1.6. Efecto de la temperatura en la producción de hidrógeno

La temperatura constituye uno de los factores más importantes en la producción de H₂; influye en la degradación del sustrato, la distribución de los subproductos, el crecimiento de bacterias y la comunidad microbiana.

En estudios realizados recientemente se han observado grandes discrepancias en los resultados obtenidos respecto al valor óptimo de la temperatura para alcanzar los niveles más altos en la producción de hidrógeno (Taguchi *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2002, Chin *et al.* 2003; Valdez-Vázquez *et al.*, 2005, Chen *et al.*, 2006; Lin y Chang, 2006; Montes- Moncivais *et al.*, 2007,). Procesos termofílicos con temperaturas que alcanzan los 80°C, o procesos mesofílicos con temperaturas de 26°C y 35°C, han destacado la necesidad imperiosa de desarrollar un estudio detallado sobre el tema a través del cual se defina la temperatura o rango de temperaturas óptimas para la producción de hidrógeno con mayores eficiencias en el desarrollo de fuentes de energía alternativa.

Los procesos anaerobios, incluida la fermentación oscura, son afectados por los cambios de temperatura debido a que las reacciones bioquímicas están directamente afectadas por este parámetro. Un cambio en la temperatura del sistema altera la eficiencia de utilización del sustrato, la actividad de producción de hidrógeno, la comunidad microbiana y la vía de fermentación.

Algunas investigaciones orientadas a evaluar las condiciones de temperatura óptima para la producción de hidrógeno, dan cuenta de la influencia de este parámetro en el proceso, observándose grandes diferencias en los resultados obtenidos. Montes-Moncivais *et al.*, (2007), evaluaron el pH y la temperatura en la producción de hidrógeno a partir de glucosa, obteniendo una máxima producción de hidrógeno de 1.17 mmol H₂/mmol de glucosa a 26°C independientemente del pH estudiado (5.5. y 6.5).

En este mismo sentido, de acuerdo con el estudio realizado por Lee *et al.* (2006), en un reactor de lodo granular inducido CIGSB, usando sacarosa como fuente de sustrato, y un intervalo de temperatura de 30-45°C, se encontró que la producción de hidrógeno fue más eficiente a 40°C (condiciones mesofílicas), especialmente cuando funciona a un bajo TRH de 0.5 h. A 40°C se obtuvo una velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) igual a 7.66 L/L-h y un máximo de rendimiento molar (RMH) de 3.88 mol H₂/mol sacarosa. El contenido de biomasa tendió a disminuir a medida que la temperatura se incrementó, lo que sugiere que la formación de lodo granular puede verse afectado a altas temperaturas. Sin embargo, el aumento de temperatura dio una mejor velocidad específica de producción de hidrógeno (VEPH), lo que significa que el promedio de la actividad celular para la producción de hidrógeno puede aumentar en la medida en que la temperatura se incremente.

Así mismo, un trabajo desarrollado recientemente por Lin *et al.* (2007), evaluó la producción de hidrógeno a partir de lodos anaerobios a varias temperaturas para la degradación de la xilosa. Los autores observaron que la producción fermentativa de hidrógeno en condiciones termofílicas de 50 - 55°C presentó la tasa más alta de rendimiento molar, la mayor VVPH y la mayor VEPH. Cuando el reactor se operó a 50°C resultó un pico en el valor de RMH de 1.4 mol H₂/mol de xilosa, en la VVPH 0.25 mol H₂/L-d y en la VEPH 0.11 mol H₂/g-SSV- día. A 45°C se produjo la más baja eficiencia en la producción de hidrógeno.

Resultados similares fueron obtenidos por Valdez - Vázquez *et al.*, (2005) quienes estudiaron la producción de hidrógeno en un reactor semi-continuo en condiciones mesofílicas y termofílicas, encontrando que la velocidad volumétrica de producción de

hidrógeno fue 60% más alta en condiciones termofílicas que en temperaturas mesofílicas. Sugirieron que este comportamiento estaba relacionado con la temperatura óptima de la enzima hidrogenasa que está entre 50 y 70°C y con las condiciones óptimas de temperatura para el crecimiento de las bacterias *Clostridium*.

Así mismo, otra de las investigaciones realizadas sobre el tema, evaluó la producción de hidrógeno a partir de la fermentación de las aguas residuales del procesamiento de arroz, en un reactor UASB, por sus siglas en inglés, encontrando que las altas temperaturas favorecen la producción de hidrógeno a partir de las aguas residuales. La temperatura óptima fue de 50°C obteniendo un RMH de 1.95 mol H₂/ mol de hexosa. (Yu *et al.*, 2002)

En la tabla 1.5 se presentan los resultados de varios estudios que evalúan la temperatura óptima para la producción fermentativa de hidrógeno. Se observa que al igual que la digestión anaerobia, hay una temperatura óptima para mesofilia y otro para termofilia, sugiriendo que este parámetro depende del inóculo, el sustrato y el tipo de reactor.

Al respecto, van Niel *et al.*, (2002), demostraron que las condiciones termofílicas extremas son favorables para la fermentación anaerobia, el máximo rendimiento molar de hidrógeno definido teóricamente 4 mmol H₂/mmol de glucosa, puede ser obtenido garantizando las condiciones térmicas. En este mismo sentido, las temperaturas extremadamente altas (70 - 80°C) hacen que el sistema sea menos propenso para ser contaminado con bacterias metanogénicas (van Groenestijn *et al.*, 1995).

Existe un gran interés en conocer y evaluar los parámetros operacionales óptimos para alcanzar una producción estable y eficiente de hidrógeno como fuente de energía alternativa, disminuyendo la enorme dependencia con los combustibles fósiles. La temperatura juega un papel importante en el rendimiento de la producción de hidrógeno. Recientes estudios indican que las variaciones en el rango óptimo de temperatura dependen del inóculo, el sustrato y el tipo de reactor. Ésta investigación con un mayor alcance agrega un factor adicional, la temperatura de origen del inóculo puede influir sobre la temperatura óptima para la producción de hidrógeno.

Tabla 1.5. Comparación de la temperatura óptima para la producción de hidrógeno en diferentes sistemas

Microorganismo	Tipo de reactor	Sustrato	Temperatura Estudiada (°C)	Temperatura óptima(°C)	Rendimiento molar máximo de hidrógeno (mol H ₂ / mol de hexosa)	Referencias
Clostridium sp- Strain No.2	Batch	Xilosa (0.96 g DQO/L)	35	35	1.8 - 2.1 mol H ₂ / mol de xilosa	Taguchi F. <i>et al.</i> , 1995
Enterobacter sp. BY-29	Batch	Glucosa (10g/L)	30, 35, 40, 45	37	1.95	Yu H-Q. <i>et al.</i> , 2002
Flora bacterial mezclada	UASB	Agua residual industria de arroz	20, 30, 35, 55	55	1.95	Yu H-Q. <i>et al.</i> , 2002
Clostridium acetobutlicum	Batch	Glucosa (2.5g/L)	30, 33, 37, 40	37	2	Chin H.L. <i>et al.</i> , 2003
Lodos productor de hidrógeno	Batch	Glucosa (10g/L)	33, 35, 37, 39, 41	41	1.67	Chen X., <i>et al.</i> , 2006
Lodos productor de hidrógeno (dominado por clostridium s.p.)	CSTR	Xilosa (20 g DQO/L)	30, 35, 40, 45, 50, 55	50	1.3 mol H ₂ / mol de xilosa	Lin C-Y., <i>et al.</i> , 2006
Lodo granular	Batch	Glucosa (3g/L)	26, 35, 55	26	1.17 mol H ₂ / mol de glucosa	Montes J.A., 2008

1.7. Seguridad en el manejo del biogás

El mayor riesgo del biogás es su inflamabilidad y explosividad al combinarse con el oxígeno contenido en el aire. El hidrógeno tiene la velocidad de combustión más alta entre todos los gases. Una combustión típica de mezcla explosiva, se presenta en una relación de 89% de volumen de hidrógeno y 11% de volumen de oxígeno². A temperatura atmosférica, el hidrógeno es muy ligero. Su densidad es aproximadamente un catorceavo a la del aire, esto hace que un escape de hidrógeno gaseoso se disperse y eleve rápidamente evitándose así la acumulación en espacios cerrados y las fuentes de ignición a ras del suelo.

En tal sentido, los riesgos potenciales de explosividad en la producción de hidrógeno se minimizan al garantizar una buena aireación en los sistemas de digestión anaerobia.

² Tomado de http://www.energiasostenible.net/fundamentos_hidrogeno.htm

Capítulo 2

TÉCNICAS ANALÍTICAS Y METODOLOGÍA GENERAL

2.1. Planeación experimental

La estrategia experimental estuvo dividida en dos etapas. La primera de ellas comprendió el estudio de la influencia del tipo de inóculo y la temperatura sobre la producción fermentativa de hidrógeno. Se evaluaron tres tipos de inóculo con diferente temperatura de origen, dos mesofílicos (a 30°C y 35°C) y uno termofílico (a 55°C). Los estudios se realizaron para cinco temperaturas de 25 a 65°C en intervalos de 10°C, utilizando glucosa como fuente de sustrato.

En la segunda etapa, se realizó la evaluación de la eficiencia de la producción de hidrógeno a partir de las aguas residuales de la industria tequilera en un reactor anaerobio SBR, considerando los resultados obtenidos en la primera fase experimental. Se trabajó con tres concentraciones de carga orgánica de 1, 3, y 5 g/L DQO y se estudió la influencia del tiempo de retención hidráulica en la producción fermentativa de hidrógeno.

2.2. Dispositivo Experimental

En la primera fase de experimentación, se realizaron pruebas de actividad anaerobia para la producción de hidrógeno en reactores pequeños (300 mL) utilizando agua residual sintética, como se detalla en el capítulo 3 numeral 3.3. Con los resultados de esta etapa, además de evaluar el comportamiento a pequeña escala del proceso, se afinaron las condiciones de operación y técnicas analíticas empleadas. Posteriormente, en una

segunda fase experimental se implementó un biorreactor a nivel de laboratorio. El sistema consistió en un reactor de vidrio marca Applikon de 6L de capacidad, operado como un SBR, por sus siglas en inglés. El reactor estuvo equipado con una chaqueta térmica para el control de la temperatura, bombas dosificadoras para el control del pH (ácido (HCl) o base (NaOH), de acuerdo con las necesidades del proceso) y bombas para la alimentación y descarga del reactor. El biogás producido fue monitoreado a través de un dispositivo de Marriotte. Se utilizó agua residual de la industrial tequilera como fuente de carbono, y el inóculo más adecuado de acuerdo con los resultados obtenidos en la primera fase experimental de esta investigación. Se evaluó el desempeño del reactor variando la temperatura y el tiempo de retención hidráulica.

2.3. Técnicas analíticas

2.3.1. Demanda química de oxígeno

Para su determinación se utilizaron tubos HACH con dicromato de potasio y ácido sulfúrico en un rango de 0 - 1500 mg DQO/L. A cada vial se le adicionaron 2 mL de la muestra utilizando una dilución de 1 en 100 y 1 en 1000.

Se colocaron los tubos 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 los tubos se dejaron enfriar por 20 minutos. De nuevo se mezcló la solución, invirtiendo los tubos cuidadosamente y se leyeron en el espectrofotómetro HACH a 620 nm. Se tomaron muestras por triplicado y se utilizó un blanco agregando a un tubo HACH 2 mL de agua destilada. El resultado obtenido está en unidades de mgO₂/L. El fundamento de esta técnica se encuentra descrito en el anexo 1.

2.3.2. Demanda bioquímica de oxígeno

El Método Respirométrico para la determinación de la DBO₅ se basa en medir el consumo de oxígeno, o la producción de CO₂, en una botella respirométrica para la determinación de la DBO₅, se calcula la diferencia entre el oxígeno disuelto en la muestra o en una dilución de la misma, entre el día 0 y el día 5.

Se utilizaron botellas Winkler de 300 mL, se realizó una dilución 1/100 y se trabajó en un rango de cuatro concentraciones de 1, 2 ,3 ,5 mL de muestra y un blanco. El fundamento de este análisis, la descripción del método respirométrico y la medición de oxígeno disuelto por el método Winkler, se encuentran detallados en el anexo 1.

2.3.3. Carbono orgánico total

Para el análisis del carbono orgánico total (COT) 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 GF/A de 2.5 cm de diámetro). Se tomó 1 mL de muestra filtrada y centrifugada diluida en 9 mL de agua destilada en un tubo HACH, conservándola con 30 µL de HCl. La muestra se analizó en un equipo Shimadzu 5050. El resultado arrojado por el equipo se presenta en unidades de mg COT/L.

2.3.4. Sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos

La determinación de los sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos se realizó por métodos gravimétricos, como se describe en el anexo 1.

2.3.5. Determinación fracción mol de H₂ y CO₂

Para la toma de muestra se utilizaron tubos de ensayo de 15 mL a los cuales se les adicionó agua saturada con cloruro de sodio acidificada con ácido sulfúrico 1N hasta bajar el pH a un valor de 2.5, cerrándolos cuidadosamente para no permitir la entrada de burbujas de aire; los tubos fueron sellados con un tapón de caucho y una tapa de plástico perforada en el centro. La muestra de biogás fue colectada por medio de una jeringa succionando y desplazando el gas por lo menos 2 veces para homogenizar la atmósfera en la botella de almacenamiento del gas. Una vez que se tiene la muestra en la jeringa, ésta se hace pasar a través del tapón de caucho que sella el tubo de ensayo. De manera simultánea en la que entra el gas de la muestra se debe permitir el desplazamiento de agua para lo cual se debe colocar una nueva aguja en el tapón. Una vez que se haya almacenado el suficiente volumen de muestra 5 - 8 mL, se deberá sacar la jeringa y rápidamente la aguja.

Para la determinación de la fracción mol de H₂ y CO₂ se tomaron 60 µL de biogás, con una jeringa Agilent de 1000 µL. Se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent Tech. 6890N) provisto 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) que trabajó a 30°C durante 2min y después se calentó a 130°C con un incremento de 20°C/min. El gas portador utilizado fue helio, la temperatura del inyector fue de 130°C y del detector de 210°C.

2.3.6. Ácidos grasos volátiles y solventes

Para este análisis, se tomó 1 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, posteriormente las muestras fueron refrigeradas a 4°C.

Para la determinación cuantitativa de los AGVs (ácido acético, propiónico, butírico e isobutírico) y solventes (etanol y acetona) se utilizó un cromatógrafo de gases (Variant) equipado con un detector de ionización de flama FID y una columna capilar de sílice Zebram ZB-FFPA de 0.53 (mm) de diámetro, 15 (m) de largo y 1 (µm) de espesor de película, con las siguientes condiciones de operación: temperatura inicial de horno en 45°C, se mantiene 1.5min aumentando a 135 °C a una tasa de 8 °C/min, temperatura del inyector, 190 °C; temperatura del detector, 210 °C; gas portador (Nitrógeno).

Se inyectaron 0.4µL de muestra. De acuerdo con el tiempo de retención RT fueron identificados los AGVs y solventes de la muestra, (Etanol: 0.23min; Acetona: 0.39min, Acético: 5.93 min, Propiónico: 7.05 min, Isobutírico: 7.05 min, Butírico: 7.38 min). Las áreas arrojadas por el sistema se compararon con las curvas de calibración a partir de las cuales se calculó la concentración de los AGVs y solventes. Los datos de validación del método se encuentran en el anexo 2.

2.3.7. Nitrógeno amoniacal (N-NH₃)

El análisis se realizó con el método descrito por en el manual HACH (Método 8038). Se toman 25 mL 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, se usa un blanco de agua destilada al cual también le fueron agregados los reactivos anteriormente mencionados.

2.3.8. 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. Adicionalmente se realizó un blanco de agua destilada al cual se le agregaron los mismos reactivos.

2.3.9. Sulfatos

Para la determinación de sulfatos se utilizaron sobres con polvo SulfaVer (Método HACH 8051). 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 genera turbidez en presencia de sulfatos. Una vez transcurridos los cinco minutos se leyó en el espectrofotómetro a 450 nm, después de haber leído un blanco de la muestra.

2.4. Validación de equipos

Para mostrar el correcto funcionamiento de los equipos de cromatografía de gases y AGVs, fue necesario realizar una validación de éstos. Esta validación está dividida en dos partes, límites de detección y repetibilidad.

Límites de detección

Se verificó con las especificaciones de los equipos que los límites de detección estuvieran por encima de los valores mínimos esperados de acuerdo con los cálculos estequiométricos y valores reportados en literatura.

Repetibilidad

Para verificar la reproducibilidad de las lecturas en cada equipo, se monitorearon estándares de solución. En el cromatógrafo de gases, para la determinación de la composición de biogás, se inyectaron muestras de CH₄ puro en diferentes cantidades y una mezcla de H₂ y CO₂ en una relación 80 - 20%. Así mismo en el cromatógrafo de gases para ácidos grasos volátiles (AGV) se inyectaron muestras de ácido acético, propiónico, butírico e isobutírico y solventes (etanol y acetona) en concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100%. La repetibilidad fue determinada por la desviación estándar, expresada como el coeficiente de variación.

2.5. Análisis estadístico

En el desarrollo de la primera etapa experimental se plantearon dos tipos de variables, variables de entrada y variables de respuesta. Como variables de entrada se utilizaron el inóculo y la temperatura y como variable de respuesta, fue utilizado el incremento de presión, como indicador de la producción de biogás en cada reactor. Un diseño factorial 3x5 fue usado para medir la influencia del tipo de inóculo (tres factores) y la temperatura (cinco niveles), sobre la producción fermentativa de H₂.

En la segunda etapa experimental se tomaron como variables de entrada la temperatura y el TRH, y como variable de salida el volumen de biogás generado y la fracción mol de H₂. Un diseño factorial 2x2 fue usado para medir el efecto de la temperatura y el tiempo de retención hidráulica sobre la producción fermentativa de hidrógeno a partir de las aguas residuales de la industria tequilera, en un biorreactor SBR.

Se tomaron muestras por triplicado bajo las mismas condiciones, así como con las respectivas variaciones consideradas en el diseño de experimentos para poder obtener el error experimental y la media muestral.

Capítulo 3

INFLUENCIA DEL TIPO DE INÓCULO Y LA TEMPERATURA SOBRE LA PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO

3.1. Introducción

Las pruebas de actividad anaerobia permiten evaluar la susceptibilidad de un efluente a ser tratado por esta vía; así mismo se conocen las velocidades de reacción, tiempos de latencia, los posibles efectos inhibitorios y las máximas eficiencias de remoción esperadas durante el tratamiento del efluente (Buitrón y Moreno, 1997).

Se ha visto que la producción de hidrógeno se ve influida por varios factores entre los que se encuentran el tipo y la concentración de sustrato (Mizuno *et al.*, 2000), la relación carbono/nitrógeno (Lin y Lay, 2004), el pH (Fang y Liu, 2002b), el tiempo de retención hidráulica (Fan *et al.*, 2006a) y la temperatura (Zhang *et al.*, 2003). De esta manera, se ha estudiado la producción de hidrógeno a partir de residuos orgánicos (Naike *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2006a), de azúcares, almidón y materiales celulósicos (Lloyd y Wyman, 2005) y desechos de la industria papelera (Valdez-Vázquez *et al.*, 2005). El hidrógeno producido por microorganismos anaerobios en reacciones de fermentación tiene el potencial para ser una fuente sostenible de energía ya que es una fuente de energía limpia que podría remplazar a los combustibles fósiles convencionales en el futuro.

En literatura son pocos los estudios que evalúan la selección del inóculo para la producción fermentativa de hidrógeno. Argun *et al.* (2009), evaluaron la producción de H₂ a partir de diferentes cultivos de bacterias anaerobias, cultivos puros de 1. *Clostridium acetobutylicum*, 2. *Clostridium butyricum*, 3. *Enterobacter aerogenes* 4. Lodos anaerobios

pretratados térmicamente y 5. Cultivo mixto de bacterias, usando residuos de trigo en solución como única fuente de energía, en una concentración de 10g/L sin ningún tipo de nutrientes. Las pruebas se realizaron en lote en botellas de 1 L. Los autores obtuvieron los mejores resultados en la producción biológica de hidrógeno usando el lodo anaerobio pretratado térmicamente, con una producción de hidrógeno de 223 mL H₂/g almidón = 1.14 mol de H₂/mol de glucosa y una velocidad específica de producción de hidrógeno (VEPH) de 32.1 mLH₂/g-h.

En este mismo sentido, Montes-Moncivasis *et al.* (2007) ,realizaron pruebas de actividad anaerobia para la selección del inóculo que presentara los mejores resultados en la producción fermentativa de hidrógeno. Los autores estudiaron cuatro fuentes de inóculo (1. Lodos activados (LA), 2. Lodo granular anaerobio (LG) 3. Estiércol de vaca (EV) y 4. Composta a base de hojarasca (CO)), usando glucosa como única fuente de carbono a 26°C y un pH de 6.2. Los autores encontraron una mayor producción de biogás usando el inóculo derivado del lodo granular, con un valor de 1.79 ± 0.20 mmol H₂, respecto a los demás inóculos evaluados (EV: 1.69 ± 0.005 mmol H₂, LA: 0.94 ± 0.12 mmol H₂ y CO 1.29 ± 0.08 mmol H₂).

Valdez-Vázquez *et al.*, (2005a) evaluaron el efecto del tratamiento de inhibición (por choque térmico y acetileno), tipo de inóculo y temperatura de incubación sobre la producción de hidrógeno a partir de residuos sólidos orgánicos. Dos tipos de inóculos fueron evaluados (mesofílico y termofílico) incubados a 37 y 55°C, respectivamente. Los autores concluyeron que el tipo de inóculo no influye de manera significativa sobre el rendimiento molar de hidrógeno (RMH) y tiempo de latencia, estos resultados están relacionados con la complejidad de ambos consorcios microbianos, que consiste en la variedad de microorganismos meso y termofílicos que responden en todas las rutas metabólicas, de tal manera que las diferencias microbianas podrían compensarse. Sin embargo los resultados muestran una diferencia en la producción de AGVs, siendo considerablemente más alta en los reactores con inóculo termofílico comparado con el inóculo mesofílico (12.965 y 7.295 mg DQO/kg masa húmeda, respectivamente).

3.2. Metodología

Para evaluar la influencia del tipo de inóculo y la temperatura sobre la producción fermentativa de hidrógeno se estudiaron cinco temperaturas (de 25 a 65°C en intervalos de 10°C) y tres consorcios microbianos con diferentes temperaturas de origen.

Las pruebas de actividad anaerobia se realizaron en botellas de 300 mL, adicionando 120 mL de agua sintética elaborada con 3 g/L de glucosa y solución mineral según Mizuno et al., (1999); agrupadas en tres soluciones para evitar su precipitación, para preparar 500 mL de de solución mineral se adiciona: Solución 1: K_2HPO_4 , 5g; Solución 2: NH_4Cl , 52 g; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.05 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2.50 g; Solución 3: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.25 g; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.05g; H_3BO_4 , 0.05g; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.05 g; $ZnCl_2$, 0.05 g. En la preparación del agua sintética por cada litro de agua se agrega 25 mL de solución 1 y 3 y 5mL de la solución 2.

En cada prueba se ajustó el pH de acuerdo con la temperatura a evaluar, utilizando una solución buffer MES monohidratado [2- Ácido monohidratado Morfolinoetanosulfónico] 69892 BioChemika Fluka 0.05M, garantizando que el pH se mantuviera por encima de 6.0 durante toda la prueba. Para la preparación del buffer se usó una de cálculo disponible en internet (<http://www.liv.ac.uk/buffers/buffercalc.html>). Para el calculo se ingresaron los datos de volumen, pH, concentración del buffer, temperatura de preparación y temperatura a la que se utilizará el buffer. Para preparar 1000 mL de buffer MES 0.05M ($pka=6.21$), $pH=6$, con una fuerza iónica de 0.024M, a una temperatura de 22°C para ser utilizada a 35°C, se debe disolver 9.76g de MES en aproximadamente 900 mL de agua destilada. Titular hasta obtener un pH de 6.14 a 22°C en el laboratorio utilizando una base o ácido fuerte monovalente como sea necesario. Completar el volumen aforando a 1000 mL con agua pura. El buffer será de 6.0 a 35°C.

Posteriormente a cada uno de los reactores se le adicionó 2 g de inóculo pretratado por choque térmico (a 104°C por 24h), con el fin de seleccionar las bacterias esporuladas productoras de hidrógeno, mejorando la eficiencia de cada uno de los inóculos.

La temperatura fue controlada por medio de una incubadora; al interior de ésta se colocó un agitador orbital que mantuvo la agitación constante en 153 rpm para cada una de las pruebas.

Los reactores se conectaron al Sistema Automático de Biodegradabilidad Anaerobia SABiA, a partir del cual se obtuvo la medición directa del biogás generado. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado, colocando un reactor adicional para la toma de biogás en la fase exponencial del proceso. Adicionalmente se hizo seguimiento de los parámetros de COT y pH, tomando una muestra de un reactor previamente seleccionado, al inicio y final de cada experimentación (por cada inóculo a la temperatura evaluada).

Se realizaron pruebas por triplicado de cada experimento bajo las mismas condiciones, así como con las respectivas variaciones consideradas en el diseño de experimentos para poder obtener el error experimental y la media muestral.

3.3 Montaje experimental

Para la realización de los experimentos en esta primera fase, se emplearon 7 biorreactores anaerobios de 300 mL, conectados individualmente a través de una manguera y válvulas de conexión al Sistema Automático de Biodegradabilidad Anaerobia SABiA, equipo que realiza la medición y seguimiento de las presiones que se generan a partir de la degradación de la materia orgánica. A su vez el SABiA está conectado a una computadora para el registro y almacenamiento de la información. Las mediciones de presión son utilizadas para calcular la cantidad de biogás generado en las pruebas de actividad anaerobia usando la ley general de gases ideales, las lecturas son registradas y graficadas instantáneamente mostrando al usuario el comportamiento de la prueba. El control de la temperatura se realiza a través de una incubadora, y la agitación se realiza por medio de un agitador orbital, que mantiene los biorreactores en constante movimiento, proporcionando las condiciones que favorecen la producción de hidrógeno (ver figura 3.1).

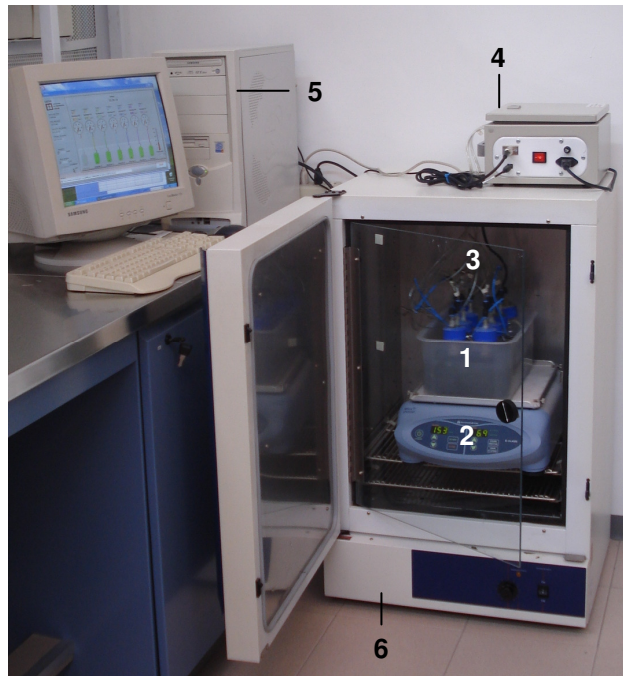


Figura 3.1. Montaje experimental pruebas de biodegradabilidad anaerobia para la producción de hidrógeno. 1. Reactores de 300mL 2. Agitador orbital 3. Mangueras de conexión 4. Sistema Automático de Biodegradabilidad Anaerobia. SABiA 5. Computadora 6. Incubadora.

3.4. Parámetros operacionales

3.4.1. Temperatura

Al revisar los estudios reportados en literatura (Lin y Cheng, 2006; Yu *et al*, 2002; Taguchi *et al.*, 1995, Chin *et al.*, 2003), se puede observar que la temperatura óptima para la producción de hidrógeno a través de fermentación oscura varía ampliamente dependiendo principalmente del tipo de microorganismo y la fuente de carbono utilizada. Como se detalla en el capítulo 1 de este trabajo, existe una marcada controversia respecto a la temperatura o rango de temperaturas reportadas como óptimas para la producción de hidrógeno. En tal sentido, esta investigación realizó la evaluación de cinco temperaturas en condiciones mesofílicas y termofílicas:

Temperatura en condiciones mesofílicas = 25°C y 35°C

Temperatura en condiciones termofílicas = 45°C, 55°C y 65°C

3.4.2. Sustrato

En la primera fase experimental de este proyecto se trabajó con glucosa como sustrato fácilmente biodegradable en una concentración de 3 g/L.

3.4.3. Fuentes de inóculo

Con el fin de evaluar la relación que existe entre la temperatura inicial del inóculo y la temperatura óptima en la que se genera el hidrógeno, para este estudio se utilizaron tres inóculos anaerobios de cultivo mixto de bacterias con diferentes temperaturas de origen, dos mesofílicos y uno termofílico, como se describe en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Origen de los inóculos

Inóculo	Origen	Temperatura de origen (°C)	SST (mg/L)	SSV (%)
MESO1	Colectado de un reactor UASB que trata las aguas de una industria cervecera ubicada en Toluca.	30	2740	89%
MESO2	Colectado de un reactor UASB que trata las aguas residuales domésticas y de industria cervecera, ubicada en Toluca	35	3110	87%
TERMO	Colectado de un reactor termofílico para el tratamiento fisicoquímico de lodos, a nivel de laboratorio.	55	3940	64%

Una vez colectados, los inóculos fueron almacenados en recipientes en de plástico y refrigerados en un cuarto frío a 4°C hasta el momento de su uso, favoreciendo su conservación. Los inóculos MESO2 y TERMO fueron almacenados de 2 a 4 meses antes de su uso, y el inóculo MESO1 estuvo almacenado durante de 1 año y medio aproximadamente, antes de ser usado en esta investigación.

3.4.4. Pretratamiento

Con el objetivo de seleccionar el consorcio microbiano con bacterias productoras de hidrógeno e inhibir a las bacterias metanogénicas, los inóculos evaluados fueron sometidos a un pretratamiento por choque térmico. Para ello, se tomó el inóculo refrigerado y se hizo pasar por un tamiz separando el agua de la biomasa, posteriormente se colocó en una bandeja metálica manteniéndola inclinada durante 30

min para eliminar el exceso de agua, finalmente la bandeja metálica se colocó en la estufa a 104°C por 24h. Este proceso se ve favorecido por la capacidad que tienen las bacterias productoras de hidrógeno, principalmente *Clostridium*, de formar esporas ante condiciones ambientales extremas (alta temperatura o baja concentración de nutrientes).

Una vez secado, el inóculo pretratado se trituró y homogenizó, a través de un tamiz de 0.01 mm de diámetro, con el fin de obtener un gránulo más pequeño que permitiera una medición exacta para inocular los reactores y favorecer la relación sustrato - microorganismo. El inóculo excedente fue almacenado en un recipiente de vidrio y puesto en el desecador hasta el momento de su uso.

3.4.5. Análisis de la producción de hidrógeno

En las pruebas de actividad anaerobia para la producción de hidrógeno se reconocen básicamente tres etapas, que se describen a continuación (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004a):

1. Fase de latencia o adaptación de los microorganismos al medio; su rapidez depende del consorcio microbiano presente en el inóculo y de las condiciones del medio. Esta etapa es afectada significativamente por los cambios de temperatura.
2. Fase de producción de hidrógeno; esta etapa se desarrolla de manera exponencial en corto tiempo, hasta alcanzar el valor máximo de producción de hidrógeno.
3. Fase de estabilización, una vez se llega al valor máximo de producción de hidrógeno, la concentración de hidrógeno se mantiene constante, mientras haya sustrato.

Para calcular el hidrógeno producido se tomó una muestra del biogás en la fase exponencial del proceso. La muestra fue almacenada en un tubo de ensayo con solución saturada con cloruro de sodio, acidificada con ácido sulfúrico a 2.5 hasta su determinación a través de cromatografía de gases (Ver Capítulo 2, sección 2.2.5. Determinación fracción mol de H₂ y CO₂).

La figura 3.2. presenta el comportamiento típico de la producción acumulada de hidrógeno en las pruebas de actividad anaerobia, se observa que la producción de hidrógeno es nula al quebrar la curva, manteniéndose constante la concentración de hidrógeno en el reactor. La velocidad específica de producción de hidrógeno (VEPH) se calculó de acuerdo con la pendiente señalada en la figura, en relación con los gramos de sólidos suspendidos volátiles presentes en el reactor. En la práctica, la VEPH, se calculó durante la producción máxima exponencial del biogás, independientemente donde se presentara.

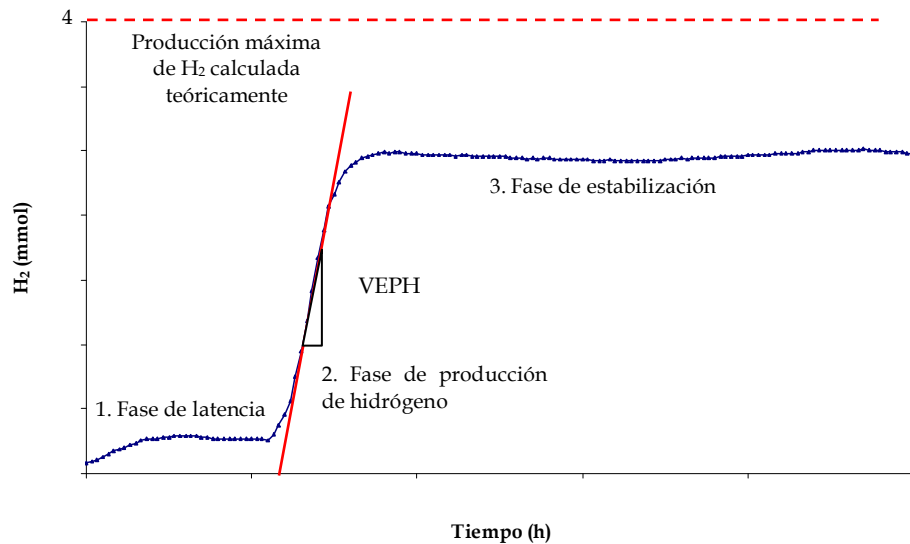


Figura 3.2. Comportamiento típico de la producción de hidrógeno.
VEPH: Velocidad Específica de Producción de Hidrógeno.

3.4.6. Automatización y control

Las pruebas de actividad anaerobia realizadas en esta investigación fueron monitoreadas en línea por el Sistema Automático de Biodegradabilidad Anaerobia SABiA, desarrollado en el Instituto de Ingeniería por Vargas *et al.* (2009).

La cuantificación del biogás producido como resultado de la degradación del sustrato se realiza por métodos manométricos, a través del cual, la presión generada en cada reactor emite una señal que pasa a través de un transductor de presión y es almacenada en una computadora. El equipo puede realizar el registro de las presiones instantáneas y las presiones acumuladas del sistema.

El software del equipo está desarrollado en Labview. El equipo está provisto de un sensor de temperatura, un sensor de presión (transductor de presión) y válvulas de conexión con capacidad para realizar el registro simultáneo de 7 reactores, como se muestra en la figura 3.3.



Figura 3.3. Sistema Automático para Biodegradabilidad Anaerobia SABiA.

1. Sensor de presión 2. Sensor de temperatura 3. Válvulas de conexión.

Con base en la información registrada por el usuario y los datos colectados en línea de los parámetros de presión y temperatura, el equipo cuantifica la producción de hidrógeno en el biogás.

El número de moles de hidrógeno producido se calcula multiplicando los moles totales por la fracción mol de hidrógeno, definida por cromatografía de gases.

$$nH_{2 \text{ producido}} = n_{\text{totales } (H_2 \text{ y } CO_2)} * (\text{fracción mol } H_2)$$

3.5. Resultados y discusión

La figura 3.4 presenta los resultados de las pruebas de actividad anaerobia para la producción fermentativa de hidrógeno en las cinco temperaturas evaluadas (25, 35, 45, 55 y 65°C), a partir del consorcio microbiano MESO1. Se encontró que no existe una diferencia significativa en la producción de hidrógeno, en condiciones mesofílicas (35°C)

y termófilas (55°C), alcanzando un rendimiento molar de 2.25 ± 0.18 mol H₂/mol de glucosa y 2.13 ± 0.14 mol H₂/mol de glucosa, respectivamente; sin embargo, los resultados muestran una mayor VEPH en condiciones mesofílicas comparada con las obtenidas a 45, 55 y 65°C, y un mayor tiempo de latencia a temperaturas altas. A 65°C se observan los resultados más bajos usando este consorcio, con un rendimiento de 1.095 ± 0.07 mol H₂/mol de glucosa.

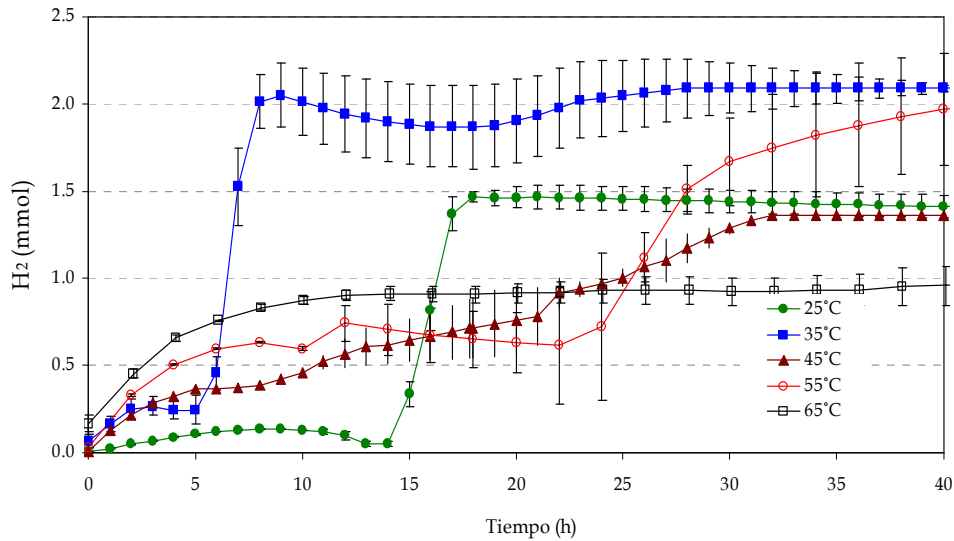


Figura 3.4. Producción de hidrógeno a diferentes temperaturas a partir del consorcio microbiano MESO1 (Glucosa 3g/L, Biomasa: 2g/L)

La figura 3.5 presenta los resultados de las pruebas de actividad anaerobia para la producción fermentativa de hidrógeno a partir del consorcio microbiano MESO2. Se encontró que no existe una diferencia significativa en la producción de hidrógeno, en condiciones mesofílicas (35°C) y termofílicas (55°C), el rendimiento molar máximo alcanzado fue de 2 ± 0.12 mol H₂/mol de glucosa y 1.92 ± 0.09 mol H₂/mol de glucosa, respectivamente. Los resultados muestran una mayor VEPH y menores tiempos de latencia en condiciones mesofílicas (25 y 35°C).

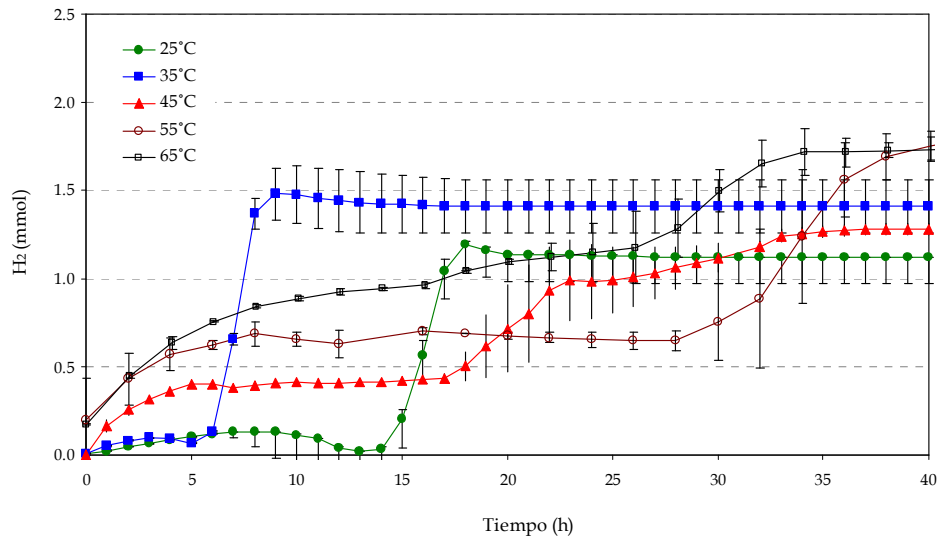


Figura 3.5 Producción de hidrógeno a diferentes temperaturas a partir del consorcio microbiano MESO2 (Glucosa 3 g/L, Biomasa: 2 g/L)

En la figura 3.6 se presentan los resultados de las pruebas de actividad anaerobia para la producción fermentativa de hidrógeno a partir del consorcio microbiano TERMO. Se encontró un máximo de producción de hidrógeno a 55°C alcanzando un rendimiento molar de 1.75 ± 0.19 mol H₂/mol de glucosa. Los resultados muestran una mayor VEPH en condiciones mesofílicas comparada con las obtenidas a 45, 55 y 65°C, y un mayor tiempo de latencia en temperaturas termofílicas. A 65°C se observó el rendimiento más bajos usando el consorcio microbiano TERMO (1.09 ± 0.08 mol H₂/mol de glucosa).

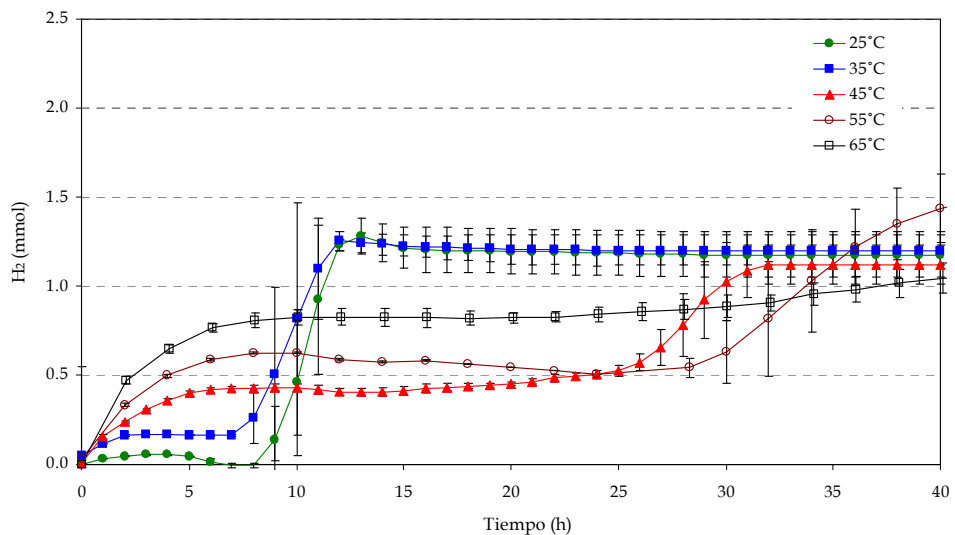


Figura 3.6. Producción de hidrógeno a diferentes temperaturas a partir del consorcio microbiano TERMO (Glucosa 3 g/L, Biomasa: 2 g/L)

La tabla 3.2 presenta la temperatura de origen de los inóculos evaluados con relación a la temperatura en la que se presentó el máximo rendimiento molar y la máxima velocidad específica de producción de hidrógeno. Los resultados muestran que en las condiciones aplicadas, no existe relación entre la temperatura inicial del inóculo y la temperatura óptima para alcanzar los niveles más altos de producción de hidrógeno y VEPH.

Tabla 3.2. Temperatura de producción de H₂ y VEPH en relación con la temperatura de origen de de los inóculos

Inóculo	Temperatura de Origen (°C)	Temperatura para la producción de H ₂ en relación con el rendimiento molar (°C)	Rendimiento molar de H ₂ (mol H ₂ /mol de glucosa)	Temperatura para la producción de H ₂ en relación con la VEPH (°C)	Velocidad específica de producción de H ₂ VEPH
Meso1	30	35	2.25± 0.18	35	0.426
Meso2	35	55	2± 0.12	35	0.238
Termo	55	55	1.75 ± 0.19	35	0.156

La diferencia en el rendimiento de los tres inóculos evaluados en esta investigación, puede estar relacionada con la diversidad de la población microbiana presente en cada uno de ellos y su capacidad para adaptarse a las condiciones del medio (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004).

En la tabla 3.3. se presenta el resumen de los resultados obtenidos en las pruebas de actividad anaerobia para la producción de H₂ a partir de los tres inóculos anaerobios evaluados.

El máximo rendimiento molar de hidrógeno obtenido fue de 2.25 ± 0.18 mol H₂/mol de glucosa alimentada, utilizando el inóculo MESO1, alcanzando rendimientos comparables con estudios realizados en cultivos puros Taguchi *et al.*, (1995), quienes reportaron que el mayor rendimiento molar de hidrógeno por mol de glucosa alimentada con bacterias *Clostridium sp* fue de 1.61 -2.36 mol/mol de glucosa y ligeramente menor a los resultados reportados por Ueno *et al.*, (2001) que obtuvieron un rendimiento molar de hidrógeno de 2.52 mol H₂/mol glucosa partir del agua residual de

una industria de azúcar, operando en un reactor continuo, a nivel de laboratorio, con microflora mixta.

Tabla 3.3. Efecto de la temperatura sobre el tipo de inóculo utilizado para la producción fermentativa de H₂

Temperatura	Tiempo de Latencia [h]	Producción de Biogás [mmol]	Rendimiento Molar de H ₂ (RMH)[mol H ₂ /mol de glucosa]	Velocidad Específica de Producción de H ₂ (VEPH)[molH ₂ /gSSV*h]
MESO1				
25°C	14	2.45	1.47 ± 0.04	0.24
35°C	5	3.75	2.25 ± 0.18	0.426
45°C	8	2.27	1.36 ± 0.06	0.032
55°C	22	3.53	2.13 ± 0.14	0.049
65°C	34	1.826	1.095 ± 0.07	0.041
MESO2				
25°C	14	1.95	1.17 ± 0.01	0.18
35°C	5	2.47	1.48 ± 0.11	0.238
45°C	16	2.07	1.24 ± 0.11	0.047
55°C	28	3.33	2 ± 0.12	0.105
65°C	14	3.2	1.92 ± 0.09	0.015
TERMO				
25°C	8	2.25	1.35 ± 0.10	0.18
35°C	7	2.08	1.25 ± 0.10	0.156
45°C	17	1.87	1.12 ± 0.06	0.056
55°C	28	2.83	1.75 ± 0.19	0.039
65°C	22	1.816	1.09 ± 0.08	0.040

El inóculo MESO1 presentó los mejores resultados en el rendimiento molar de hidrógeno, la mayor velocidad específica de producción de hidrógeno y el menor tiempo de latencia, lo cual puede estar relacionado con el mayor número de bacterias por gramo de sólidos suspendidos volátiles (SSV) y la capacidad de adaptación de los microorganismos al medio.

Para evaluar la producción de hidrógeno y el desempeño de los inóculos evaluados es importante considerar la máxima concentración de hidrógeno (rendimiento molar alcanzado) y la velocidad específica de producción. En este sentido, a pesar de que los

resultados muestran que no existe una diferencia notoria en el rendimiento molar de hidrógeno, en condiciones mesofílicas (35°C) y termofílicas (55°C), la velocidad específica de producción de hidrógeno es más alta en condiciones mesofílicas, por lo cual se recomienda trabajar bajo estas temperaturas.

Se observó un mayor tiempo de latencia a temperaturas altas. Se deduce que es debido a la necesidad de las bacterias a adaptarse fisiológicamente al nuevo medio; por lo tanto, para evaluar correctamente el efecto de la temperatura es necesario proporcionar el tiempo suficiente para que el inóculo se aclimate a la temperatura de prueba.

Se observó que para todos los casos evaluados, la velocidad específica de producción de hidrógeno (VEPH) fue mayor a 35°C, independientemente de la temperatura de origen del inóculo.

3.5.1. Análisis de carbono orgánico

En la tabla 3.4 se muestran los resultados del análisis de carbono orgánico total COT. Se observa un aumento en la concentración de carbono al final de las pruebas de biodegradabilidad anaerobia en algunas de las pruebas, razón por lo cual, se realizaron pruebas de actividad anaerobia sin sustrato, obteniendo de igual forma un aumento en la concentración del carbono (ver tabla 3.5) que se explica por los restos de material celular que quedan después del pretratamiento térmico de los lodos.

Tabla 3.4. Carbono orgánico por tipo de inóculo para la producción fermentativa de H₂

Temperatura (°C)	COT (mg/L) Inicial	COT (mg/L) Final	% de remoción
MESO1			
35	393.0	423.5	-8%
45	461.5 ± 48.6	407 ± 27.4	12%
55	444.1 ± 24.7	445.5 ± 19.7	0%
65	448.4	463.2	-3%
MESO2			
35	432 ± 3.5	430.4 ± 27.7	0%
45	416.6 ± 35.4	420.7 ± 16.7	-1%
55	439.3 ± 9.4	468.2 ± 0.6	-7%
65	448.9	473.4	-5%
TERMO			
35	383.8	371.2	3%
45	382.9 ± 23.8	387 ± 5.8	-1%
55	375.1 ± 1.1	406.8 ± 28.6	-8%
65	397.0	437.3	-10%

Tabla 3.5. Análisis del carbono orgánico total sin sustrato

Inóculo sin glucosa	COT (mg/L)			% de remoción
	Inicial	Medio	Final	
Meso1	363.4	376.7	351.9	3%
Meso2	322.8	380.1	324.4	0%
Termo	323.8	462.1	379.1	-17%

Es importante anotar que para lograr la producción de hidrógeno se interrumpe el proceso natural de digestión anaerobia para la degradación de la materia orgánica; en tal sentido, esta fase del proceso no busca disminuir la materia orgánica, simplemente la transforma en ácidos orgánicos fácilmente degradados por otros microorganismos que deberán ser tratados posteriormente en un sistema anaerobio para la producción de metano, en estudios posteriores.

3.6. Conclusiones parciales

La temperatura inicial de aclimatación del inóculo no influye sobre la temperatura óptima para la producción de hidrógeno.

Los resultados muestran que no existe una diferencia notoria en el rendimiento molar de hidrógeno, en condiciones mesofílicas (35°C) y termofílicas (55°C), independientemente de la temperatura de origen del inóculo; sin embargo, la velocidad específica de producción de hidrógeno es más alta en condiciones mesofílicas, por lo cual se recomienda trabajar bajo estas temperaturas.

Se sugiere que para evaluar correctamente el efecto de la temperatura se debe aclimatar el inóculo a la temperatura de prueba, proporcionando el tiempo suficiente para que las bacterias productoras de hidrógeno, se adapten e inicien su actividad.

Se observó un aumento en la concentración del carbono al final de las pruebas, lo cual se explica por el carbono orgánico que aportan los inóculos, a partir de los restos del material celular que quedan después del pretratamiento térmico de los mismos. En este sentido, es importante anotar que la producción de hidrógeno no busca disminuir la materia orgánica presente en las aguas dado que es un proceso intermedio de la digestión anaerobia.

Las temperaturas termofílicas son poco favorables para la conversión de energía, dado a que se requiere invertir una mayor cantidad de energía para aumentar la temperatura en 20°C, (pasando de 35 a 55°C) y obtener tan solo un 15% más de hidrógeno. Adicionalmente presentan un mayor tiempo de latencia y velocidades específicas de producción de hidrógeno más bajas, por lo tanto para que exista un balance entre la producción de hidrógeno y la reconversión de energía, es conveniente operar los reactores biológicos en un rango de temperaturas mesofílicas, considerando la concentración final y la velocidad específicas de producción de hidrógeno.

Capítulo 4

PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO A PARTIR DE AGUAS DE LA INDUSTRIA TEQUILERA EN UN REACTOR SBR

4.1. Introducción

A pesar de la complejidad y heterogeneidad de las aguas residuales industriales, investigaciones recientes han reportado el uso de efluentes industriales para la producción fermentativa de hidrógeno, entre las cuales se destacan el uso de aguas residuales de la industria agrícola y alimentos, con alto contenido celulosa y almidón, aguas ricas en carbohidratos biodegradables como las de la industria de lácteos, aceite de oliva o cerveceras (Kapdan y Kargi., 2006). Las bacterias acidogénicas, responsables de la generación de hidrógeno, metabolizan la materia orgánica biodegradable presente en las aguas residuales. Este proceso puede ser inhibido por la presencia de sustancias tóxicas que superen los límites de tolerancia o la presencia en el consorcio microbiano de bacterias consumidoras de hidrógeno y de los productos intermedios.

A nivel industrial son muchos los procesos que requieren altos volúmenes de agua para su producción, tal es el caso de la industria tequilera. Para tener una idea de los volúmenes de residuos líquidos que se generan, es preciso considerar que para producir 1 litro de tequila, se generan 10 litros, en promedio, de agua residual (Linerio *et al.*, 2004). Considerando que en el estudio más actualizado del sector, el Consejo Regulador del Tequila estimó que en el año 2007 se produjeron 284.4 millones de litros de tequila,

lo cual implica una descarga de 2,844 millones de litros de vinazas por año (7.79 millones de litros vinaza / día).

Debido a la elevada concentración de materia orgánica en el efluente, la diversidad de sustancias que la forman, su elevada temperatura de descarga y su pH ácido; las vinazas se catalogan como aguas residuales complejas, de composición similar a la destilación de otras bebidas alcohólicas y contribuyen con un elevado aporte contaminante en los sitios de disposición final, de ahí la importancia de buscar nuevas alternativas para su tratamiento y sustentabilidad que contrarresten los efectos ambientales negativo que trae su mala disposición, aunado a los altos volúmenes que se arrojan.

El bio-hidrógeno es producido por microorganismos obtenidos a través de cepas puras o cultivos mixtos de bacterias derivados de sistemas de tratamiento de aguas residuales, composta, estiércol, residuos sólidos, residuos agrícolas o del suelo, después de recibir un pre-tratamiento para la selección de bacterias productoras de hidrógeno. Estos microorganismos en un proceso intermedio de degradación de la materia orgánica obtienen hidrógeno como subproducto. En tal sentido, las aguas residuales con altos contenidos de materia orgánica son un excelente sustrato para la producción de hidrógeno; sin embargo, dado la complejidad y heterogeneidad de las aguas residuales industriales estas exigen estudios detallados con el fin de evaluar la factibilidad y eficiencia en la transformación de los compuestos y la generación de hidrógeno.

En la tabla 4.1, se presenta una síntesis de la revisión bibliográfica realizada con los resultados de investigaciones recientes que utilizan aguas residuales industriales para la producción fermentativa de hidrógeno. A pesar de que las condiciones de experimentación de cada uno de los estudios presentan características específicas que los hacen diferentes como el tipo de reactor, tipo de microorganismos y el sustrato utilizado, las variables de operación se mantienen en un rango relativamente estrecho con pHs entre 5.5 y 6.0 y tiempos de retención hidráulica de 6 h cuando se trabaja con reactores acidogénicos y de 1 a 2 días cuando se trabaja en sistemas de dos fases para la producción de hidrógeno y metano. Frente a la temperatura, no existe un rango

específico de operación, se destacan condiciones mesofílicas a 35°C y termofílicas entre 55 y 60°C.

Respecto a los sustratos es importante mencionar que ésta es la primera investigación que evalúa la producción de hidrógeno a partir de las aguas de la industria tequilera en un reactor SBR, considerando trabajos previos que sobre el tema se han realizado al interior del grupo de investigación. Se destaca el uso de residuos sólidos orgánicos (Lee *et al.*, 2008; Chun-Feng *et al.*, 2008; Valdez-Vázquez *et al.* 2005; Shin *et al.*, 2004; Lay *et al.*, 1999) con composiciones de hidrógeno en el biogás de 42 a 58% en reactores continuos y semi- continuos y de 60 a 73% en reactores en lotes. Sompong *et al.*, 2007 lograron obtener un 66% de H₂ usando aguas residuales de aceite de palma y Wan-Qian *et al.*, 2008, obtuvieron fracciones de H₂ entre 30 y 53% a partir de la melaza de azúcar de remolacha.

En el marco de este contexto, el objetivo de esta segunda etapa experimental fue evaluar la eficiencia de la producción de hidrógeno a partir de las aguas residuales de la industria tequilera en un reactor anaerobio SBR, estudiando el efecto de la temperatura y el tiempo de retención hidráulica.

Tabla 4.1. Experiencias en la producción de hidrógeno a partir de aguas residuales industriales

Sustrato	Tipo de reactor	Condiciones de experimentación			Composición del biogas	Referencia
		Temperatura (°C)	pH	TRH		
Fracción Orgánica de Residuos Sólidos	Reactor termófilico de 10L	55	5.5	1.3d	H ₂ (52-56%) CO ₂ (41-47%)	Chun-Feng <i>et al.</i> , 2008
Melaza colectada de una refinería de azúcar de remolacha	Reactor de cama granular de lodos expandidos (EGSB, por sus siglas en inglés)	35	No controlado	6-1h	30-53% H ₂	Wan-Qian <i>et al.</i> , 2008
Suero	Reactor en batch y reactor continuo, completamente mezclado (CSTR, por sus siglas en inglés)	35	4.0-5.0	24h	por debajo del 3% H ₂	Peilin <i>et al.</i> , 2007
Agua de papas	Dos reactores continuos de tanque agitado (CSTR por sus siglas en inglés)	-	5.5	6	45% (v/v) H ₂	Heguang <i>et al.</i> , 2008
Efluente de aceite de palma	Reactor discontinuo secuencial anaerobio (SBR, por sus siglas en inglés)	60	5.5	4 d	66% H ₂	Sompong <i>et al.</i> , 2007
Biomasa de residuos de cerveza (alto contenido de celulosa)	Lotes (viales de 250ml)	36+/- 1C	5.5 - 7.5	-	45% H ₂	Yao-Ting <i>et al.</i> , 2006
Fracción orgánica de residuos sólidos municipales	Reactores de vidrio de 1.5L	35 y 55C	5.5 y 6.4	-	Cond. Termo 58% H ₂ Cond. Meso 42% H ₂	Valdez Vazquez <i>et al.</i> , 2005
Fracción orgánica de residuos sólidos municipales	Botellas de 120 ml	37	5	10h	60% H ₂	Lay <i>et al.</i> , 1999
Agua residual de industrias que utilizan ácido cítrico como materia prima	Reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés), de 50m ³	35- 38	6.8-7.2	12	-	Yang <i>et al.</i> , 2006
Aguas residuales del procesamiento de manzanas	Botellas de 295ml	-	6.1	-	60% H ₂	van Ginkel <i>et al.</i> , 2005
Aguas residuales industria de papas		-		-		
Residuos de alimentos obtenidos de un comedor	Botellas de 715ml	35 y 55	5.6	5d	69% H ₂	Shin <i>et al.</i> , 2004
Residuos vegetales de cocina (75gDQO/L)	Cuatro reactores en lote, volumen de trabajo de 1L	55	6.0 y 7.0	50h	73% H ₂	Lee <i>et al.</i> , 2008

4.2. Efecto del tiempo de retención hidráulica en la producción de hidrógeno

4.2.1. Tiempo de retención hidráulica

El tiempo de retención hidráulica (TRH) se define como la relación entre volumen del reactor y el caudal de alimentación ($\theta=V/Q$) o el inverso de la tasa de dilución (D^{-1}). Este parámetro puede ser utilizado para seleccionar las poblaciones microbianas de tal manera que sólo los consorcios microbianos con tasas de crecimiento mayor a la tasa de dilución pueden permanecer en el reactor. Las tasas de dilución altas (bajos TRH) podrían utilizarse para hacer un lavado completo de las bacterias metanogénicas dado que la tasa de crecimiento de estas bacterias es mucho más baja que el de las bacterias productoras de H_2 (0.0013 h^{-1} y 0.05h^{-1} respectivamente. Ver tabla 4.2)

El efecto del tiempo de retención hidráulica, ha sido evaluado en muchos estudios que coinciden con los resultados logrados en esta investigación. Los bajos tiempos de retención hidráulica favorecen la producción de hidrógeno cuando se utilizan aguas residuales reales. No obstante, existen evidencias que demuestran que este principio se cumple para sustratos fácilmente biodegradables como es el caso de la glucosa, lactosa o sacarosa.

Al respecto Wen-Hsing *et al.*, (2009), utilizaron un reactor discontinuo secuencial anaerobio (ASBR, por sus siglas en inglés) para evaluar la producción biológica de hidrógeno a partir de residuos orgánicos con alto contenido de carbohidratos. Los autores encontraron un contenido de H_2 en el biogás de aproximadamente 37% con una duración de ciclo de 4 h y observaron una disminución en el contenido de hidrógeno proporcional al incremento del tiempo de duración del ciclo. La velocidad volumétrica de hidrógeno fue de 388 mL H_2/g SSV-d con una duración de ciclo de 4 horas, siendo dos veces más alta que la alcanzada a 8h.

Han y Shin, (2004) estudiaron el efecto de la tasa de dilución sobre la producción de hidrógeno a partir de residuos de alimentos. Obtuvieron un 50% de reducción en DQO, 70% de eficiencia en la formación de H_2 , 100 L de H_2 acumulado, con una tasa de dilución de 4.5 d^{-1} o un TRH de 5.3 h. Yu *et al.*, (2002) encontraron que la máxima

velocidad específica de hidrógeno fue 9.33 L H₂/g SSV - d a 55°C, un TRH de 2 h y pH de 5.5. Para este estudio se utilizaron aguas residuales del procesamiento de arroz.

4.3. Metodología

En la segunda etapa experimental de este estudio, se realizaron dos bloques de ensayos. En el primer bloque, se evaluó el efecto de la temperatura en la producción de hidrógeno a partir de efluentes de la industria tequilera, a 25 y 35°C, considerando los resultados obtenidos en la primera fase experimental de este trabajo y estudios previos realizados en el grupo de investigación. En el segundo bloque se evalúa la influencia del tiempo de retención hidráulica en la producción fermentativa de hidrógeno con TRH de 6 y 12 h

Se utilizó un biorreactor marca Applikon operado como un SBR anaerobio (reactor discontinuo secuencial), con 6 L de capacidad, un volumen de intercambio de 3 L, 1 L para el crecimiento de la biomasa y 2 L de espacio vacío para la fase gaseosa. El biorreactor cuenta con un sensor de temperatura, un sensor de pH y un agitador vertical. El sistema se maneja a través de un biocontrolador (Applikon ADI 1030 Bio Controller), cuya función es mantener las variables operacionales de control en el valor establecido por el usuario.

Adicionalmente, el sistema cuenta con temporizadores para activar y desactivar las bombas de alimentación y descarga; una chaqueta térmica y un sistema de recirculación de agua para el control de la temperatura; para el control del pH, el sistema cuenta con dos bombas dosificadoras de ácido y base de acuerdo a los requerimientos en la operación del reactor. El control ácido se realiza con ácido clorhídrico (HCl) en una concentración 1N y el control básico con sosa (NaOH) en una concentración 1N (ver figura 4.1). El pH y la agitación se mantuvieron constantes en un valor de 5.5 y 153 rpm respectivamente, durante todas las pruebas. El sistema utiliza cuatro bombas peristálticas Masterflex.

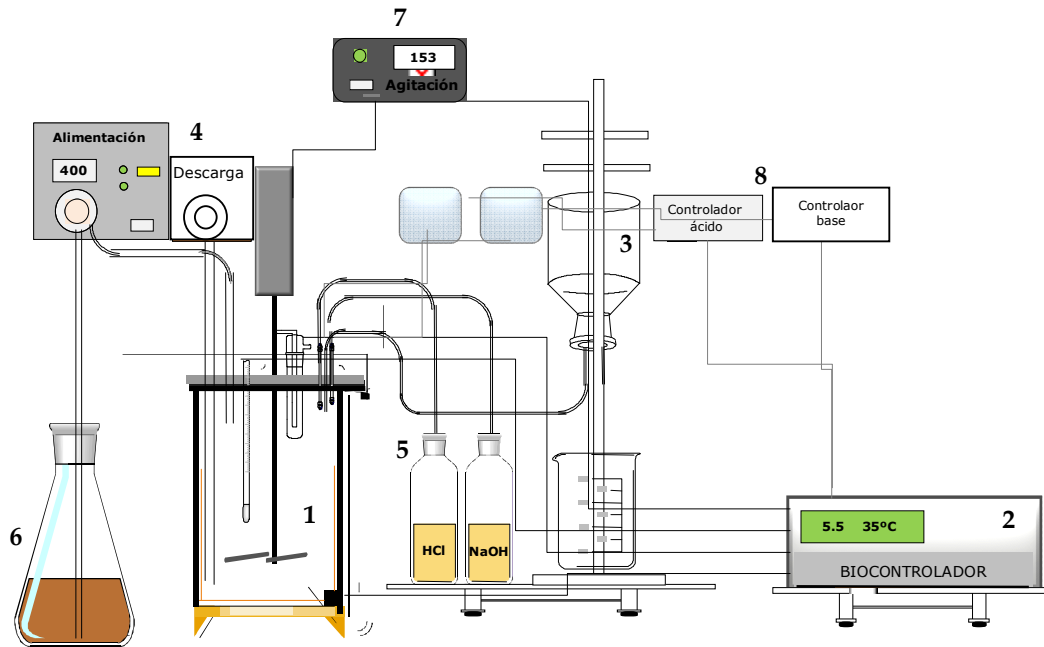


Figura 4.1 Montaje experimental 1. Reactor SBR 2. Biocontrolador 3. Dispositivo Marriotte 4. Bombas de alimentación y descarga 5. Soluciones para el control del pH 6. Alimentación 7. Control del agitador 8. Control de bombas.

El SBR anaerobio fue manejado con los siguientes tiempos de operación: TRH 12 h, alimentación: 3 min, reacción: 11 h 20 min, sedimentación: 30 min, descarga: 7 min, tiempo muerto: 2 min. Cuando el reactor operó con un TRH de 6 h los tiempos de operación fueron: alimentación: 3 min, reacción: 5 h 20 min, sedimentación: 30 min, descarga 5 min, tiempo muerto: 2 min.

El biorreactor fue inoculado con el consorcio microbiano MESO1 (inóculo anaerobio colectado de un reactor UASB que trata las aguas de una industria cervecera), a partir del cual se obtuvo los mejores resultados respecto al porcentaje de biodegradabilidad y menor tiempo de latencia usando glucosa como fuente de carbono. El reactor fue inoculado con 60g de consorcio microbiano pre-tratado y 3 litros de agua residual que contenía aguas residuales de la industria tequilera, como única fuente de carbono y energía, y solución mineral según Mizuno *et al.*, (1999), agrupadas en tres soluciones para evitar su precipitación, para preparar 500 mL de de solución mineral se adiciona: Solución 1: K_2HPO_4 , 5g; Solución 2: NH_4Cl , 52 g; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.05 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2.50 g; Solución 3: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.25 g; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.05g;

H₃BO₄, 0.05g; NiCl₂•6H₂O, 0.05 g; ZnCl₂, 0.05 g. En la preparación del agua sintética por cada litro de agua se agrega 25 mL de solución 1 y 3 y 5mL de la solución 2.

El biogás generado, fue recuperado usando el método de desplazamiento de agua, con un dispositivo de Mariotte. Para cada temperatura fueron monitoreados el volumen y composición del biogás, carbono orgánico y producción de ácidos grasos, al inicio y final de cada ciclo (de acuerdo con el TRH cada 6 o 12, dos veces por semana). Así mismo, se realizó el seguimiento a la biomasa, con las pruebas de sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos fijos (SSF) y sólidos suspendidos volátiles (SSV).

La producción acumulada de hidrógeno fue calculada considerando el volumen de la fase gaseosa dentro de reactor y el volumen de gas liberado.

4.4. Parámetros operacionales

4.4.1. pH

Para el control de las bacterias metanogénicas (consumidoras de H₂) en el reactor SBR utilizado en esta investigación, se mantuvo el pH controlado en 5.5, favoreciendo condiciones ácidas para el crecimiento de las bacterias productoras de hidrógeno y la inhibición de las bacterias metanogénicas. En tal sentido es importante mencionar que las bacterias metanogénicas tienen actividad en un rango de pH de 6 a 8. Algunas especies acidófilas como *Methanobacterium espanolae*, crece a pH de entre 5.6 y 6.2.

4.4.2. Tasas de crecimiento

En la tabla 4.2 se presentan las tasas de crecimiento de las bacterias fermentadoras, metanogénicas y sulfatorreductoras. Es importante aclarar que estas tasas de crecimiento se obtuvieron a nivel experimental en condiciones ideales de crecimiento y constituyen solo un valor de referencia para los experimentos que se realizan en condiciones reales. Se observa que la tasa de crecimiento de las bacterias metanogénicas es inferior a la de los microorganismos productores de H₂ (bacterias fermentadoras). De acuerdo con la literatura para evitar el crecimiento de las bacterias

metanogénicas se utilizan tiempos de retención hidráulica bajos (o tasas de dilución altas), a partir de los cuales no se favorece la acumulación ni el crecimiento de estos organismos.

Tabla 4.2. Tasas de crecimiento de las bacterias fermentadoras, metanogénicas y sulfatorreductoras

Tipo de bacterias	Donador de electrones	Fuente de carbono	Tasa de crecimiento (μ)	Tiempo de retención hidráulica (TRH)
Fermentadoras	azúcar DBO	azúcar	0.05 h^{-1}	20 h
Metanogénicas	acetato DBO	acetato	0.0013 h^{-1}	80 h
	H_2	CO_2	0.021 h^{-1}	48 h
Sulfato - reductora	acetato DBO	acetato	0.021 h^{-1}	48 h

Fuente: Rittmann y McCarty, 2001

Para la selección del tiempo de retención hidráulica fueron considerados varios aspectos. Primero se consideraron los trabajos de investigación que evalúan la producción de hidrógeno a partir de efluentes industriales y en los cuales se concluye que en medio ácido las bacterias metanogénicas no logran sobrevivir independientemente del TRH en el que se opere. También se consideró que la tasa de crecimiento de las bacterias fermentadoras es mayor que la tasa de crecimiento de las bacterias metanogénicas.

4.4.3. Temperatura

Se trabajó a 35°C considerando los resultados obtenidos en la primera fase experimental. Bajo esta temperatura se obtuvo óptimo desempeño en el rendimiento molar y la máxima VEPH. Adicionalmente, se evaluó la producción de hidrógeno a 25°C , teniendo en cuenta un estudio previo elaborado en el grupo de investigación, en el cual se concluye que 26°C es una temperatura adecuada para la producción de hidrógeno a partir de las vinazas tequileras (Montes-Moncivais, 2008).

4.4.4. Sustrato

Para el desarrollo de esta fase experimental se trabajó con agua residual de una industria tequilera ubicada en Guadalajara, Jalisco. El agua fue almacenada en tambos de 50L a 3°C .

Las vinazas son líquidos residuales producto de la destilación del mosto fermentado, una vez que los productos alcohólicos fueron separados por medio de calor y presión. Las vinazas son aguas recalcitrantes difícilmente descompuestas por los procesos biológicos habituales, como el de lodos activados, ya que su color característico café rojizo se debe probablemente a la presencia de melanoidins. Investigaciones sobre el tema han mostrado que la presencia de melanoidins en el lavado de las destilerías a partir de melazas (Sirianuntapiboon et al., 1988). Estos polímeros son de color marrón formado por reacciones amino-carbonilo (Wedzicha y Kaputo, 1992), tienen propiedades antioxidantes y son a menudo tóxicos a los microorganismos utilizados en el tratamiento de éstos residuos (Kitts et al., 1993).

Físicamente, la vinaza es un líquido turbio color café rojizo, con un contenido de sólidos en suspensión variable que lo pueden hacer fluido o espeso, con un olor característico a alcohol- caramelo. Las vinazas las forman fibrillas de agave que no se retuvieron en la etapa de filtración del jugo, células de levadura agotada, azúcares residuales, ácidos esterres, alcoholes superiores razón por la cual se catalogan dentro del tipo de aguas residuales complejas (Linerio *et al.*, 2004).

La descarga de las vinazas se realiza a temperaturas cercanas a los 90°C, con las siguientes características: altas concentraciones de materia orgánica (demanda química de oxígeno (DQO) entre 50 y 80g/L y demanda biológica de oxígeno (DBO) de 40g/L en promedio), pH inferior a 4, concentración promedio de sólidos totales (ST) de 36g/L y una elevada concentración de sales, sobre todo Ca, K y SO₄. Los sulfatos promueven el desarrollo de compuestos potencialmente tóxicos e inhibitorios en la fermentación anaerobia y el crecimiento de bacterias sulfato-reductoras que compiten con las bacterias productoras de H₂.

4.4.5. Aclimatación

Antes de comenzar con la aclimatación a las vinazas, se utilizó glucosa para activar el consorcio microbiano MESO1 esporulado después del pretratamiento por choque térmico, incrementando la concentración de 0.5 a 2 g/L. La aclimatación de los microorganismos se realizó a través de la estrategia de tiempos fijos descrita por Moreno-Andrade y Buitrón (2004).

Es recomendable comenzar la aclimatación a bajas concentraciones de sustrato para que una vez que los microorganismos se adapten al tipo de sustrato se aumente la concentración del tóxico a la que están expuestos a través de los ciclos (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004). En tal sentido, la aclimatación a las vinazas se realizó a una concentración de 0.5 g/L incrementándola hasta 5 g/L. La estrategia seguida (tiempo fijos), fue aplicada dando un tiempo de reacción de 24 h durante los primeros 4 ciclos disminuyendo a 18 y 12 h. Se realizó el seguimiento del volumen de biogás generado y fracción mol de H₂.

4.4.6. Condiciones operacionales

En la tabla 4.4 se presenta un cuadro consolidado con los parámetros de operación del reactor SBR.

Tabla 4.3. Condiciones operacionales del reactor SBR

Parámetro	Valor
Reactor	Reactor anaerobio SBR, con 6 L de capacidad, 3 L de volumen intercambiable y 1L de lodos.
Inóculo	MESO1 (inóculo anaerobio colectado de un reactor UASB que trata las aguas de una industria cervecera), en una concentración 20 g/L.
Pretratamiento	Choque térmico a 104°C por 24 h
pH	5.5
Agitación	153 rpm
Sustrato	Vinazas diluidas(concentración 1-5g/L) y solución mineral
Temperatura	26 y 35°C
TRH	12 y 6 horas

4.5. Resultados y discusión

4.5.1. Caracterización de las vinazas

Las aguas residuales utilizadas en este estudio, fueron colectadas de una industria tequilera ubicada en Jalisco, México con el apoyo del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías CUCEI - Universidad de Guadalajara. Se colectaron tres lotes: el primero fue colectado en octubre de 2007, el segundo lote el 26 de agosto de 2008 y el tercer lote el 29 de octubre de 2008. Una vez obtenidas las vinazas, fueron almacenadas

en tambos de plástico a 3°C y se les realizó los análisis químicos de DQO, DBO₅, fenoles, sulfatos, nitrógeno amoniacal y pH, aplicando las técnicas analíticas descritas en el capítulo 2.

Las aguas colectadas en el primer lote fueron utilizadas en la parte exploratoria de esta investigación con el fin de conocer el comportamiento del inóculo en la degradación de las vinazas; el segundo y tercer lote fueron utilizados en el reactor SBR para la producción de hidrógeno a 26 y 35°C.

La tabla 4.3 muestra los resultados obtenidos en la caracterización de los efluentes de la industria tequilera. Con base en estos resultados se puede concluir que las aguas del efluente se ven fuertemente afectadas por el tipo de tequila que se elabore, en general las características del efluente varían respecto al porcentaje de biodegradabilidad, concentración de fenol, nitrógeno amoniacal, lo cual constituye una desventaja para la operación de los sistemas de tratamiento de dichas aguas. En este mismo sentido es importante destacar las altas concentraciones de sulfato contenida en estas aguas.

Tabla 4.4. Caracterización de las vinazas

Parámetro	Vinazas tequileras Lote 1	Vinazas tequileras Lote 2	Vinazas tequileras Lote 3
DBO ₅	32,500	20,900	19,800
DQO	40,000	30,500	29,900
Relación DBO ₅ /DQO	0.81	0.7	0.66
Fenoles (mg/L)	14	81	44
Sulfato (mg/L)	810	937	900
N-NH ₃ (mg/L)	300	118	105
pH		3.2	4.0

4.5.2. Reactor SBR a 25°C y TRH de 12 h

4.5.2.1. Aclimatación

Para lograr la aclimatación se utilizó la estrategia de tiempos fijos. Las esporas obtenidas después del tratamiento térmico se reactivaron y enriquecieron con glucosa en una concentración de 0.5 y 1 g/L durante 10 ciclos de 24 h cada uno (10 días).

Posteriormente, se adicionó vinaza a diferentes concentraciones que se fueron incrementando en un rango de 0.5 a 5 g/L. La aclimatación a esta temperatura se llevó a cabo en 23 ciclos (16.5 días).

La figura 4.2 muestra el comportamiento del reactor a través del volumen de biogás generado. Se observa que a medida que aumenta la carga orgánica, el volumen de biogás aumenta. Sin embargo, con una concentración de 3 g/L, los microorganismos se vieron inhibidos durante tres ciclos, sin producir biogás, por lo cual fue necesario disminuir la carga orgánica a 2 g/L. Estos resultados coinciden con los reportados por Montes- Moncivais *et al.*, (2007), quienes evaluaron la producción de hidrógeno a 25°C con el mismo consorcio microbiano. Los autores concluyen que en las concentraciones de vinazas de 3 y 5 g DQO/L, la generación de metabolitos como ácidos grasos y solventes puede presentar una inhibición en la generación del biogás por acumulación de los subproductos (Montes- Moncivais *et al.*, 2007).

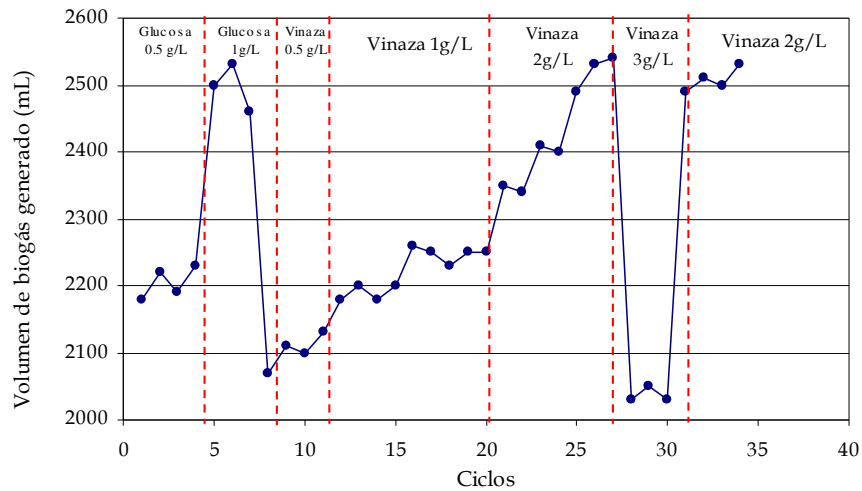


Figura 4.2 Aclimatación a las vinazas a 25°C (Concentración: 0.5 a 3 g/L ,TRH 12 h)

La figura 4.3 muestra la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) en cada ciclo, en relación con el incremento de la concentración de vinazas en reactor. La VVPH máxima obtenida en el reactor fue de 14 mL H₂/L-h, en el ciclo 2 con una concentración de vinazas de 0.5 g /L DQO. Se observa la disminución de la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno en la medida en que aumentan los ciclos, hasta alcanzar la estabilidad. Esta disminución puede estar relacionada con la

presencia de grupos bacterianos consumidores de H_2 presentes en las vinazas y su adaptación a las condiciones del medio.

A partir del ciclo 23, después de 27 días de operación, se logró la estabilidad del reactor que se evidencia con una producción constante de biogás de 2530 a 2550 mL en 12 horas.

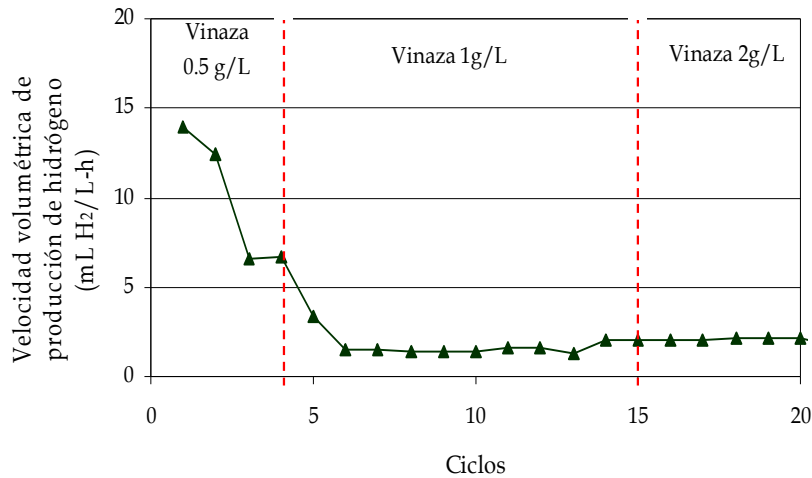


Figura 4.3 Seguimiento producción de biogás a 25°C, en un reactor SBR a partir de efluentes agroindustriales (Vinaza: 0.5 y 2g/L, TRH 12 h)

4.5.2.2. Composición del biogás

Del ciclo 1 al 3, el reactor fue alimentado con glucosa como sustrato fácilmente biodegradable, pH 5.5 y TRH de 12 horas. Se observó que la proporción de hidrógeno se mantuvo en un rango de 24 a 38%. A partir del ciclo 4, bajo las mismas condiciones de operación, el reactor fue alimentado con vinazas en una concentración de 0.5 – 2 g/L. Se observó una disminución gradual del hidrógeno generado, que fue reemplazado por un incremento proporcional de metano y dióxido de carbono. La producción de hidrógeno disminuyó en un rango de 21 al 3%, y la producción de metano incrementó del 0 al 40% (Figura 4.4)

Con base en los resultados obtenidos se puede inferir que el uso de vinazas ocasionó un cambio en el consorcio microbiano presente en el reactor, favoreciendo la permanencia de nuevas comunidades consumidoras de hidrógeno (bacterias metanogénicas). Así mismo, los resultados de cromatografía detectaron trazas de sulfuro de hidrógeno evidenciando la presencia de bacterias sulfato-reductoras en el

reactor. Estos resultados sugieren la presencia de bacterias metanogénicas, resistente a condiciones de acidez (bajos pHs) generando alguna clase de adaptación que permite que sobrevivan en el biorreactor, así mismo, sugiere la necesidad de disminuir el tiempo de retención hidráulica con lo cual se causaría el lavado de las bacterias metanogénicas; dado que las tasas de crecimiento específico de estas bacterias son mucho más largas que las reportadas para las bacterias productoras de hidrógeno (0.0013 y 0.05 h⁻¹ respectivamente, ver tabla 4.2).

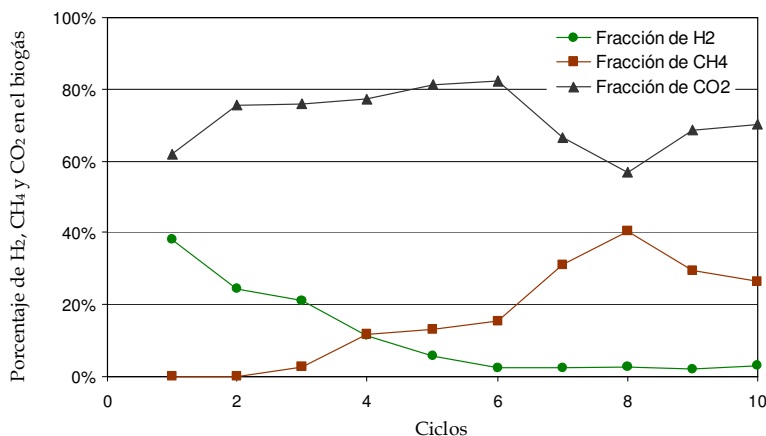


Figura 4.4 Resultados cromatografía de gases. Reactor SBR a 25°C, TRH 12 h (Fuente de sustrato Glucosa: 0.5 - 1g/L, Vinaza: 0.5 -2g/L)

4.5.2.3. Subproductos

Los resultados de la prueba de carbono orgánico total, COT, presentados en la tabla 4.5 muestran un incremento del porcentaje de remoción de 35.3 a 41.8% en relación al aumento de la concentración de vinazas.

Tabla 4.5. Resultados prueba de carbono orgánico total; reactor SBR a 25°C ,TRH 12 h

Concentración de Vinaza (g/L DQO)	COT Inicial (mg/L)	COT Final (mg/L)	Porcentaje de remoción	Balance de Carbono	
				Carbono removido fase líquida (mg)	Carbono presente en la fase gas (CH ₄ y CO ₂) (mg)
1	553.8	357.9	35.3%	587.7	529.84
2	770.6	548.5	41.8%	666.5	

Para realizar el balance de materia se consideraron dos aspectos, la cantidad de carbono removido en la fase líquida y la cantidad de carbono presente en la fase gas como CH₄ y CO₂.

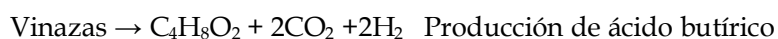
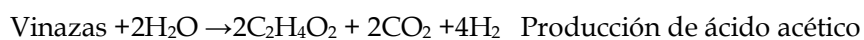
De acuerdo con el balance de carbono, se encontró que el 90% del carbono removido se fue para la formación de metano y dióxido de carbono. Al hacer el balance de masa con una concentración de vinazas de 1 g/L, se puede obtener el balance de carbono así: 587.7 mg C fueron removidos de la fase líquida, de los cuales el 529.9 mg, equivalente al 90.1%, fueron transformados a CH₄ y CO₂, se deduce que la cantidad de carbono restante 57.8 mg de C, equivalente al 9.8%, fue utilizado para el crecimiento de la biomasa.

Con una concentración de vinazas de 2 g/L los resultados muestran un porcentaje de remoción de carbono más alto, 41.8% aunque no aumento proporcionalmente con la concentración del sustrato, asociado a la presencia de una comunidad microbiana aclimatada.

A diferencia del proceso metanogénico, donde los ácidos orgánicos son consumidos, en la producción fermentativa de hidrógeno hay una generación intrínseca de ácidos orgánicos (principalmente acético, propiónico y butírico) y solventes junto con la generación de H₂ y CO₂.

La tabla 4.6 muestra los resultados de la prueba de AGVs a 25°C, la acetona fue el subproducto que presentó mayores concentraciones, seguido de ácido isobutírico, acético y propiónico. Recientes estudios han demostrado que existen varias correlaciones entre el porcentaje de hidrógeno en el biogás y los productos de la fermentación en la fase acuosa. Altas producciones de hidrógeno, están relacionadas con altos niveles de producción de etanol y bajas cantidades de ácido propiónico (Yang *et al.*, 2007; Wan-Qian *et al.*, 2008).

A partir de los resultados de cromatografía para AGVs y solventes, se deducen las reacciones estequiométricas que estaría presentes en el reactor:



Vinazas $\rightarrow 2C_2H_6O_2 + 2H_2O$ Producción de ácido propiónico

Vinazas $\rightarrow 4C_3H_6O_2 + 2C_2H_4O_2 + 2CO_2 + 2H_2O$ Producción de propianato y acetato

Vinazas $\rightarrow 2C_2H_6O + 2CO_2$ Producción de etanol

Formación de metano a partir de los ácidos volátiles

$C_4H_8O_2 + H_2O + CO_2 \rightarrow C_2H_4O_2 + CH_4$ A partir de ácido butírico

$C_2H_4O_2 \rightarrow CH_4 + CO_2$ A partir de ácido acético

Formación de metano a partir de la reducción de dióxido de carbono

$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$

Tabla 4.6. Resultados prueba de AGVs; reactor SBR a 25°C, TRH 12 h.

Concentración de Vinaza (g/L DQO)	Etanol (ppm)	Acetona (ppm)	Acético (ppm)	Propiónico (ppm)	Isobutírico (ppm)	Butírico (ppm)
1	12.28	100.55	70.67	48.92	183.31	0.00
2	0.92	116.70	1.89	0.00	0.00	40.25
Promedio	6.60 ± 8	108.63 ± 11.4	36.28 ± 48.6	24.46 ± 34.5	91.65 ± 129.6	20.13 ± 28.4

Las bajas concentraciones de los ácidos grasos generados como productos intermedios del proceso de digestión anaerobia, asociado con la alta concentración de CH_4 detectable en el biogás, evidencian el consumo de éstos productos intermedios por parte de las bacterias metanogénicas presentes en el biorreactor.

Los resultados obtenidos en esta fase experimental mostraron un cambio en el consorcio microbiano pasando de la selección de bacterias productoras de hidrógeno a bacterias metanogénicas, a causa de las vinazas, aspecto que no favoreció la producción de hidrógeno. En tal sentido, fue necesario evitar el crecimiento de las bacterias metanogénicas en el reactor, para lo cual se consideraron algunos parámetros que caracterizan a este grupo de bacterias, son microorganismos de lento crecimiento que requieren un prolongado TRH para evitar su lavado, a partir de lo cual se decidió trabajar con TRH de 6h.

En literatura, recientes estudios han demostrado que los bajos TRH favorecen la producción de H₂ (Wen-Hsing *et al.*, 2009; Chin-Chao *et al.*, 2008). Así mismo algunas investigaciones consideran operar con bajos TRH como parámetro óptimo para la producción fermentativa de hidrógeno (Heguang *et al.*, 2008; Wan-Qian *et al.*, 2008).

Por otra parte, a pesar de que las condiciones ácidas dentro del reactor (pH: 5.5) en principio no serían favorables para el crecimiento de las bacterias metanogénicas, se deduce, que la característica ácida de las aguas de vinaza (pH inferior a 4), habrían aclimatado previamente a las bacterias metanogénicas haciéndolas resistentes a pHs extremadamente bajos, contrariamente a los reportes de la literatura respecto a los requerimientos de pH de los procesos metanogénicos, que establecen como rango de operación valores entre 6.6 y 7.6. De acuerdo con la literatura valores inferiores de 6 pueden inhibir a los microorganismos y suspender la generación de metano (Rittmann y McCarty., 2001).

4.5.3. Reactor SBR a 25°C y TRH de 6 h

Al realizar las pruebas a 25°C, con un TRH de 6h se observó que la cantidad de biogás generada no fue suficiente para lograr la medición en el dispositivo Mariotte. Lo anterior indica que las bajas temperaturas (25°C) no favorecen la producción de hidrógeno utilizando aguas residuales de la industria tequilera. En este sentido, al realizar una revisión de las investigaciones recientes que utilizan sustratos complejos para la producción de hidrógeno se hace evidente que las temperaturas óptimas para la producción de hidrógeno en estas condiciones, varían de un rango mesofílico a 35±2°C y un rango termofílico a 55±5°C.

Considerando lo expuesto anteriormente, y con el fin de mejorar los resultados logrados hasta esta segunda etapa experimental, se incrementó la temperatura a 35°C, evaluando la producción de hidrógeno a 12 y 6 h. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

4.5.4. Reactor SBR a 35°C y TRH de 12 h

4.5.4.1. Aclimatación

Para realizar la aclimatación a 35°C, se utilizó la estrategia de tiempos fijos, se realizó un enriquecimiento de la biomasa MESO1, con glucosa en una concentración de 1 y 3 g/L durante 4 ciclos, posteriormente se adicionaron concentraciones de vinaza de 1, 3 y 5 g/L. La aclimatación se llevó a cabo en 25 ciclos. Una vez que se obtuvo un volumen de biogás más o menos constante se fue aumentando la concentración de carga orgánica hasta un máximo de 5 g/L (ver figura 4.5).

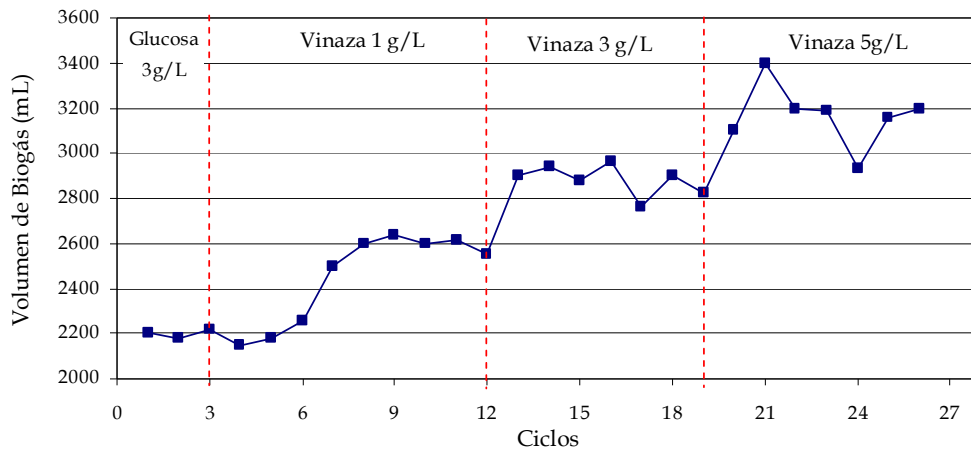


Figura 4.5 Producción de biogás a 35°C, TRH 12 h, a partir de efluentes agroindustriales (Vinaza: 1 - 5 g/L)

A partir del ciclo 23, después de 19 días de operación, se logró la estabilidad del reactor que se evidencia con una producción constante de biogás de 3160 a 3200 mL en 12 horas.

4.5.4.2. Composición del biogás

Los resultados de la prueba de cromatografía de gases a 35°C, para el hidrógeno, metano y dióxido de carbono que se presentan en la figura 4.6, corresponden a los ciclos del 21 al 28 con una concentración de vinazas de 5g/L DQO, una vez se logró la estabilidad del reactor. Los resultados muestran, una composición de hidrógeno en biogás con un valor promedio de 3%, la presencia de metano con un valor promedio de 31%, y la presencia de dióxido de carbono con un valor promedio del 66%. A pesar de

que el proceso de selección de las bacterias productoras de hidrógeno, por choque térmico, resulta efectivo para inhibir a la mayoría de bacterias metanogénicas, el reactor fue contaminado con bacterias metanogénicas, aún cuando las condiciones ácidas del sistema no eran favorables para el crecimiento de éstas las bacterias. Es muy probable que las aguas residuales de la industria tequilera hayan tenido la presencia de bacterias metanogénicas y estas hayan permanecido en el reactor, afectando la producción de hidrógeno.

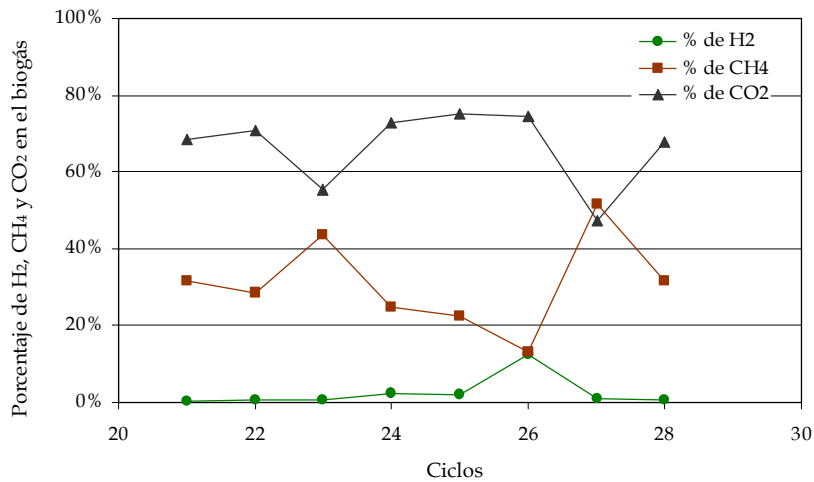


Figura 4.6 Resultados cromatografía de gases. Reactor SBR a 35°C, TRH 12h. (Fuente de sustrato Vinaza: 5 g/L)

4.5.4.3. Subproductos

Los resultados de la prueba de carbono orgánico total COT presentados en la tabla 4.7 muestran el porcentaje de remoción alcanzado en el reactor a 35°C. Con una concentración de vinazas de 5 g/L, se observó una remoción de 23.24%. De acuerdo con el balance de carbono, se encontró que la mayor parte del carbono removido se fue a la formación de CH₄ y CO₂. Comparando el carbono removido de la fase líquida y el carbono presente en la fase gas, se puede obtener el balance de carbono, así: 979.5 mg C fueron removidos de la fase líquida, de los cuales el 935 mg, fueron transformados a CH₄ y CO₂, se deduce que la cantidad de carbono restante 44.5 mg de C, fue utilizado para el crecimiento de la biomasa.

Tabla 4.7. Análisis del carbono orgánico total en el reactor SBR a 35°C y TRH de 12 h

Concentración de Vinaza (g DQO/L)	COT Inicial (mg/L)	COT Final (mg/L)	Porcentaje promedio de remoción	Balance de carbono	
				Promedio carbono removido fase líquida (mg)	Promedio carbono presente en la fase gas (CH ₄ y CO ₂) (mg)
5	1438	1064	23.24%	979.5	935
	1362	1083			

El proceso fermentativo se asocia universalmente con la generación de productos intermedios del metabolismo, como ácidos y solventes, debido al metabolismo acidogénico de las bacterias que intervienen en el proceso. La producción de AGVs está relacionada con la conversión de la fracción orgánica en productos intermedios de fermentación con la ayuda de grupos específicos de bacterias anaerobias (Lee *et al.*, 1999).

En la tabla 4.8 se presenta los resultados del análisis de ácidos grasos volátiles (AGVs) en el reactor SBR a 35°C, con un TRH de 12 h, con una concentración de vinaza de 5 g/L. Se observa una mayor concentración de ácido acético con una concentración de 565 mg/L en comparación con los demás subproductos, seguido por ácido propiónico y ácido butírico. Reportes en literatura han mostrado que la acumulación de ácido propiónico es desfavorable para la producción de hidrógeno (Zhu y Yang, 2004.). Al respecto, Wang *et al.* (2006), encontraron una alta concentración de ácido propiónico a 35°C usando agua residual de remolacha asociada a una ineficiente producción fermentativa de hidrógeno. Otro estudio realizado por Lee *et al.* (2006), mostró que el ácido propiónico representa cerca del 20% de los subproductos metabólicos en la producción mesofílica de hidrógeno, a partir de la sacarosa, usando lodo granular. Los resultados obtenidos en este estudio para el ácido propiónico corroboran las bajas fracciones de hidrógeno en el biogás afectando la eficiencia del proceso.

La concentración de etanol, ácido isobutírico y acetona no es significativa respecto a las concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico.

Tabla 4.8. Prueba de AGVs en reactor SBR a 35°C y TRH de 12 h.

Concentración de vinaza (g/L DQO)	Etanol (ppm)	Acetona (ppm)	Acético (ppm)	Propiónico (ppm)	Isobutírico (ppm)	Butírico (ppm)
5	0.98	71.65	683.15	441.49	2.01	390.86
5	0.87	84.78	744.78	463.32	0.68	432.87
5	0.51	6.20	255.59	307.74	5.56	279.58
Promedio	0.79 ± 0.24	67.4 ± 19.61	594.51 ± 209	404.18 ± 84.23	2.75 ± 2.52	367.77 ± 79.2

4.5.5. Reactor SBR a 35°C y TRH de 6 h

4.5.5.1. Condiciones operacionales

En la tabla 4.9 se presenta un cuadro consolidado con los parámetros de operación del reactor SBR operado a 35°C, con un TRH de 6 h

Tabla 4.9. Condiciones operacionales del reactor SBR a 35°C con un TRH de 6h

Parámetro	Valor
Reactor	Reactor anaerobio SBR, con 6 L de capacidad, 3L de volumen intercambiable y 1L de lodo
Inóculo	MESO1 (inóculo anaerobio colectado de un reactor UASB que trata las aguas de una industria cervecera)
Pretratamiento	Choque térmico a 104°C por 24 h
pH	5.5
Agitación	153rpm
TRH	5.5. horas, duración del ciclo 6 h.
Sustrato	Vinazas diluidas y solución mineral
Aclimatación	Glucosa durante 14 ciclos (ciclo 1 al 4 de 24h, ciclo5-9 12h, ciclo 9 -14 6h. Tiempo 7 días) Concentración (0.5 -3 g/L) Vinazas durante 43 ciclos (ciclo 15 al 57 de 6h) (tiempo 14.5 días) Concentración (1 a 5 g/L)

4.5.5.2. Aclimatación

En la figura 4.7 se presenta el seguimiento a la producción de biogás a 35°C y un TRH de 6h. Se observa que con una concentración de vinazas de 5g/L DQO se alcanza un volumen similar obtenido con glucosa en una concentración de 1g/L. Así mismo se

puede observar que no hay un cambio notorio en el volumen de biogás generado cuando el reactor se alimento a 3 y a 5 g/L de vinazas. Estos resultados sugieren que se alcanzó la velocidad específica de producción de hidrógeno (VEPH) máxima, a partir de lo cual se podría considerar aumentar la concentración de biomasa en el reactor y con esto aumentar la VEPH.

Se logró una producción estable y eficiente de hidrógeno a partir del ciclo 52 con un volumen de 2570mL en 6 h, evidenciándose una velocidad más alta de producción de biogás, que la obtenida a 12 h (3200mL) en un 62%

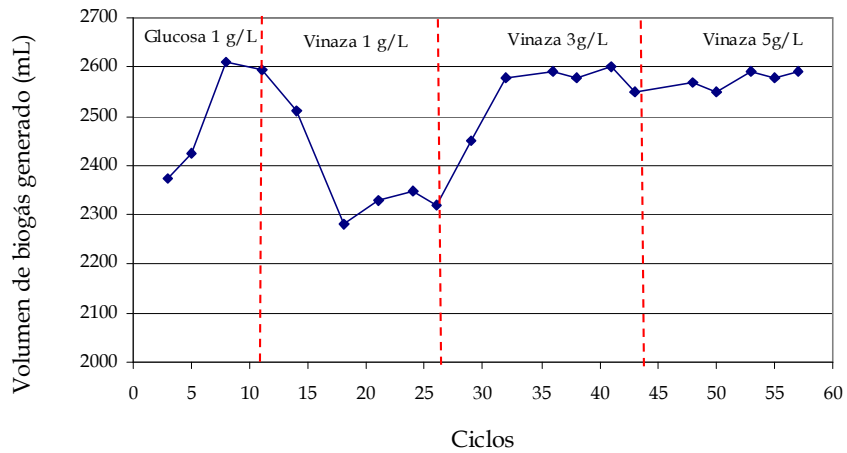


Figura 4.7. Producción de biogás a 35°C, TRH 6h (Vinaza: 1 - 5g/L)

En la figura 4.8 se muestran los resultados de la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno, a diferentes concentraciones de vinaza (de 1 a 5 g/L), alcanzando un máximo de 58 mLH₂/L-h, con una concentración de 5 g/L. Se puede observar que a pesar del aumento en la carga orgánica, la velocidad volumétrica permaneció constante, en las concentraciones de vinazas de 3 y 5 g/L; se deduce que a pesar de que exista mayor concentración de carbono disponible en el reactor, la velocidad con la que los microorganismos degradan los compuestos orgánicos es la misma, alcanzando la VEPH máxima.

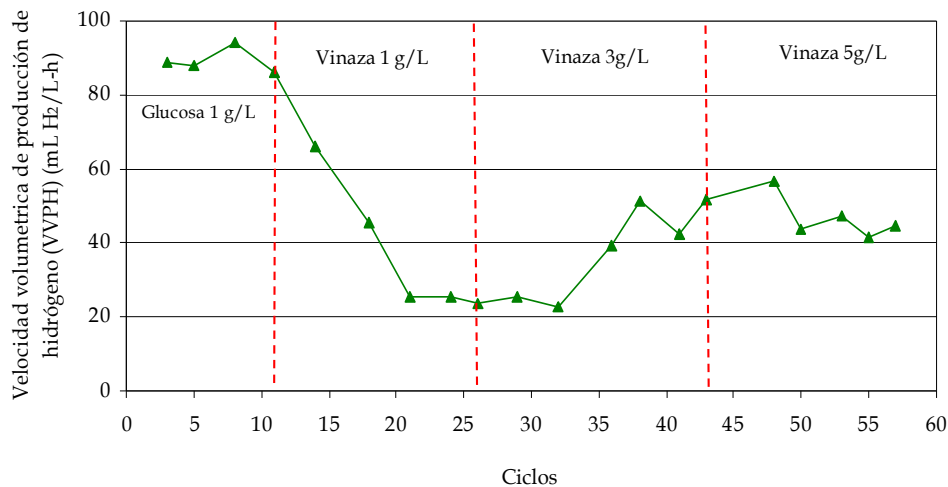


Figura 4.8. Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno a 35°C, TRH 6h (Vinaza: 0.5 y 5g/L)

4.5.5.3. Composición del biogás

Cuando el reactor fue operado con glucosa (del ciclo 1 al 14) la fracción de hidrógeno se mantuvo en un rango de 67 a 60 % (ver figura 4.9). Bajo las mismas condiciones estudiadas el reactor fue alimentado con vinazas se observó que la fracción de hidrógeno se mantuvo en un intervalo promedio de 19 a 33%, con un valor máximo de 40% y un valor mínimo de 16%, proporcional al aumento observado en la fracción de CO₂ en el biogás., del 53 al 69%. Cabe destacar que no se detectó la presencia de metano en ninguna de las muestras.

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que al operar con un tiempo de retención hidráulica de 6 h, las altas tasas de dilución, evitan de manera efectiva el crecimiento de bacterias metanogénicas seleccionando bacterias productoras de hidrógeno en el consorcio microbiano presente en el reactor.

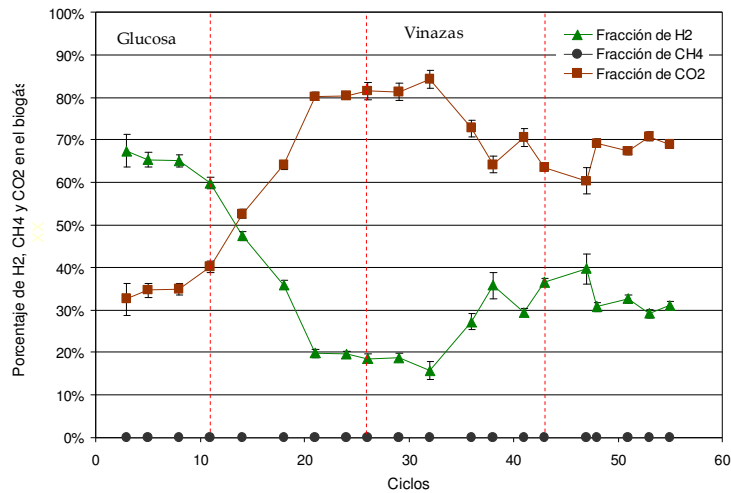


Figura 4.9. Resultados cromatografía de gases. Reactor SBR a 35°C, TRH: 6 h (Fuente de sustrato Vinaza: 3 - 5 g/L)

En la tabla 4.10 se presenta un consolidado de los resultados obtenidos en varias investigaciones que utilizan aguas residuales industriales como fuente de sustrato para la producción fermentativa de hidrógeno, comparable con los resultados alcanzados en esta investigación

Al comparar los resultados con la literatura, es posible observar grandes diferencias en cuanto a la velocidad específica de producción de hidrógeno (VEPH) que pueden estar relacionadas con la complejidad en la degradación de los sustratos, la biomasa activa en el consorcio microbiano y el tipo de reactor. Wan-Qian *et al.*, (2008) al emplear melaza colectada de un ingenio azucarero de remolacha para la producción de H₂, obtuvieron una VEPH de 74.4 mLH₂/gSSV-h. Kim *et al.*, (2004) usando residuos de alimentos como única fuente de sustrato, observaron una velocidad específica de producción de hidrógeno de 111.2 mLH₂/gSSV-h. Por otra parte, Lay *et al.*, (1999) a partir de la fracción orgánica de los residuos sólidos municipales lograron una VEPH de 16.8 mLH₂/gSSV-h, comparable con la lograda en este estudio (12.38 mLH₂/gSSV-h). Lo anterior demuestra que se obtuvieron buenos resultados si se tiene en cuenta que las vinazas son aguas inhibitorias con alto contenido de compuestos recalcitrantes.

Tabla 4.10. Producción de H₂ a partir de sustratos reales en sistemas continuos, semi-continuos o batch

Sustrato	Tipo de reactor	Composición del biogas	Velocidad volumétrica de la producción de H ₂ (VVPH)	Rendimiento molar (RMY)	Velocidad específica de producción de hidrógeno (VEPH)	Referencia
Fracción Orgánica de Residuos Sólidos	Reactor termofílico de 10L	H ₂ (52-56%) CO ₂ (41-47%)	10.4 L/L-d	NR	205 ml H ₂ /g SSV	Chun-Feng <i>et al.</i> , 2008
Melaza colectada de una refinería de azúcar de remolacha	Reactor de cama granular de lodos expandidos (EGSB, por sus siglas en inglés)	30-53% H ₂	0.71 L/L-h	3.47 mol/mol sucrose	3.16 mmol H ₂ /g SSV h	Wan-Qian <i>et al.</i> , 2008
Agua de papas	Dos reactores continuos de tanque agitado (CSTR por sus siglas en inglés)	45% (v/v) H ₂	Máximo 270ml/h Promedio 119 ml/h	NR	30 L/ kg ST	Heguang <i>et al.</i> , 2008
Efluente de aceite de palma	Reactor discontinuo secuencial anaerobio (SBR, por sus siglas en inglés)	66% H ₂	NR	2.24 molH ₂ /mol hexosa	NR	Sompong <i>et al.</i> , 2007
Biomasa de residuos de cerveza (alto contenido de celulosa)	Lotes (viales de 250ml)	45% H ₂	NR	NR	68.6 mLH ₂ /g SVT	Yao-Ting <i>et al.</i> , 2006
Fracción orgánica de residuos sólidos municipales	Botellas de 120 ml	60% H ₂	NR	NR	140- 180 mLH ₂ /g SVT	Lay <i>et al.</i> , 1999
Agua residual de industrias que utilizan ácido cítrico como materia prima	Reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés), de 50m ³	-	0.72m ³ /m ³ reactor-d	0.84mol H ₂ /mol hexosa consumida	NR	Yang <i>et al.</i> , 2006
Aguas residuales del procesamiento de manzanas	Botellas de 295ml	60% H ₂	0.09 LH ₂ /L-h	NR	NR	van Ginkel <i>et al.</i> , 2005
Aguas residuales industria de papas			0.21 LH ₂ /L-h	NR	NR	
Residuos de alimentos obtenidos de un comedor	Botellas de 715ml	69% H ₂	-	Inóculo termo: 1.8 mol H ₂ /mol hexosa, Inóculo meso: 0.9 mol H ₂ /mol hexosa	Inóculo termo: 19 mLH ₂ /gSSV-h, Inóculo meso: 0.7 mLH ₂ /gSSV-h	Shin <i>et al.</i> , 2004
Residuos vegetales de cocina (75gDQO/L)	Cuatro reactores en lote, volumen de trabajo de 1L	73% H ₂	NR	0.49mmol H ₂ / g DQO	0.44 mmolH ₂ /gSSV-h	Lee <i>et al.</i> , 2008
Aguas residuales de la industria tequilera (Vinazas)	Reactor discontinuo secuencial (SBR, por sus siglas en inglés)	40 -47% H ₂	0.057 LH ₂ /L-h 57 mLH ₂ /L-h	10.66mmolH ₂ /gDQO	0.3634 mmol H ₂ / gSSV-h 11.55ml H ₂ /gSSV-h	Este estudio

Van Ginkel *et al.*, (2005), estudiaron la producción de hidrógeno usando efluentes industriales de la fabricación de dulces, procesamiento de manzana e industria de papas. Reportaron que la producción más alta de hidrógeno fue obtenida a partir de las aguas residuales de la industria de papas con un valor de 210 mLH₂/gDQO comparable con los resultados obtenidos en esta investigación de 150 mL H₂/gDQO_{alimentada}.

Respecto a la composición del biogás, se han reportado fracciones de hidrógeno que van del 30 al 56% en reactores a nivel de laboratorio con flujo continuo, semi -continuo o tipo SBR (Chun *et al.*, 2008; Wan-Qian *et al.*; 2008; Yang *et al.*, 2006) y de 60 a 73% en botellas de 250 a 750 mL. (Fan *et al.*, 2006a; lay *et al.*, 1999; van Ginkel *et al.*, 2005, Shin *et al.*, 2004). En esta investigación se observaron fracciones de H₂ en el biogás en un intervalo promedio de 19 a 33%, comparables con los obtenidos por Wan-Qian *et al.*, (2008) del 30 al 53% H₂ a partir de la melaza de azúcar de remolacha; Zhu *et al.*, (2008) quienes obtuvieron una fracción de H₂ de 45% usando agua de papas y los resultados de Fan *et al.*, (2006b) que muestran una fracción de H₂ de 45% lograda a partir de la degradación de residuos de cerveza.

En la tabla 4.11 se presenta el consolidando de los resultados obtenidos en la producción de hidrógeno a 25 y 35°C con un TRH de 6 y 12 h, partir de la degradación de las vinazas en un reactor SBR. Los cálculos fueron realizados con base en la composición máxima de H₂ obtenido en el biogás.

Tabla 4.11. Resultados de la operación del reactor SBR con un TRH de 6 y 12h

Parámetro	35°C	26°C	35°C	26°C
TRH	6 h	6 h	12 h	12 h
Volumen de biogás	2600 mL	-	3200 mL	2200 mL
Composición del biogás	H ₂ : 47 - 31%		H ₂ : 12 - 1%	H ₂ : 21 - 3%
	CH ₄ : 0%		CH ₄ : 52 - 30%	CH ₄ : 3 - 27%
	CO ₂ : 53 - 60%		CO ₂ : 46 - 69%	CO ₂ : 76 - 70%
Velocidad volumétrica de producción de H ₂ (VVPH)	58 mL H ₂ / L- h	La cantidad de biogás generado no fue suficiente para lograr el desplazamiento del agua	10.6 mL H ₂ / L- h	14 mL H ₂ /L-h
Rendimiento molar (RMH)	3.64 mmolesH ₂ /gDQOa		0.81 mmolesH ₂ /gDQOa	2.91 mmolesH ₂ /gDQOa
Velocidad específica de producción de hidrógeno (VEPH)	0.78 mmolesH ₂ /gSSV-h		0.27 mmolesH ₂ /gSSV-h	0.17 mmolesH ₂ /gSSV-h
	12.38 mLH ₂ /gSSV-h		8.68 mLH ₂ /gSSV-h	5.12 mLH ₂ /gSSV-h

DQOa = DQO alimentada

Los bajos resultados de la fracción hidrógeno en la composición del biogás, cuando el reactor fue operado con un TRH de 12h a 25 y 35°C, están asociados con la presencia de bacterias metanogénicas afectando la eficiencia en la producción de hidrógeno.

Resultados similares fueron obtenidos por Yang *et al.*, (2007) quienes estudiaron la producción de hidrógeno a partir de la degradación de las aguas residuales de suero de queso, usando un cultivo mixto de bacterias, en un reactor continuo a 35°C y un TRH de 24 h, a diferentes concentraciones de carga orgánica (5 a 14 g/L). Los autores obtuvieron composiciones de hidrógeno en el biogás que van del 3% al 30% en la medida en que se incrementó la carga orgánica. Los resultados evidenciaron la presencia de metano en todas pruebas, incluso cuando el pH fue inferior a 5. Los autores afirman que es posible que los organismos metanogénicos puedan persistir en la biopelícula formada en las paredes del biorreactor o en los materiales floculentos en suspensión protegiéndose de los pHs bajos. Ellos observaron que el contenido de hidrógeno disminuía rápidamente cuando aumentaba el contenido de metano en el biogás.

Por otra parte, es importante aclarar que no existen investigaciones en las que se haya evaluado la producción de hidrógeno a partir de agua residual de la industria tequilera. Los trabajos publicados en los que se trabaja con sustratos complejo (Montes-Moncivais *et al.*, 2007) a pesar de reportar resultados para reactores SBR, en muchos de ellos se trabajan en reactores por lotes cambiando la biomasa en cada experimento, garantizando de esta manera la selección del consorcio microbiano productor de hidrógeno.

4.5.5.4. Subproductos

El resultado de los análisis de carbono orgánico total a 35°C, con un TRH de 6 h, (ver tabla 4.12.), muestran un porcentaje de remoción promedio, del 17%, con una concentración de vinazas de 3 y 5 g/L. A pesar de que la producción de hidrógeno es un proceso intermedio de la degradación de la materia orgánica, los resultados muestran que contribuye en menor proporción a la disminución del carbono en las aguas que se manifiesta en la generación de CO₂ e incremento de la biomasa.

Tabla 4.12. Análisis del carbono orgánico total en el reactor SBR a 35°C y TRH de 6 h

Concentración de Vinaza (g / L DQO)	COT Inicial (mg/L)	COT Final (mg/L)	Porcentaje promedio de remoción
3	1956	1576	19.4%
3	1523	1263	17.1%
5	1853	1581	14.7%
5	1729	1419	17.9%

En la tabla 4.13 se presentan los resultados del análisis de ácidos grasos volátiles en el reactor SBR a 35°C, TRH de 6h y una concentración de vinazas de 5g/L DQO, el ácido acético fue el subproducto predominante representando el 45.2% del total de AGVS.

Tabla 4.13. Prueba de AGVs en reactor SBR a 35°C y TRH de 6 h.

Concentración de vinaza (g/L DQO)	Etanol (ppm)	Acetona (ppm)	Acético (ppm)	Propiónico (ppm)	Isobutírico (ppm)	Butírico (ppm)
5	0.30 ± 0.13	14.81 ± 3.58	41.52 ± 4.86	19.67 ± 2.08	5.68 ± 2.85	9.74 ± 0.07

Por reportes en literatura se sabe que la producción de hidrógeno esta acompañada de formación de ácido acético y butírico. En la fermentación de ácido acético se producen 4 moles de hidrógeno a partir de 1 mol de glucosa, mientras que en la fermentación de ácido butírico se producen 2 mol de hidrógeno. Adicionalmente la producción de hidrógeno, se puede llevar a cabo por la combinación de la fermentación de ácido acético y ácido butírico a partir del cual se generan 2 mol de hidrógeno. La proporción estequiométrica de ácido acético y butírico es de 1.5 mol / mol. Esto aclara que un mayor rendimiento de la producción de hidrógeno es obtenido a través de la fermentación ácido acético.

Sin embargo, los resultados obtenidos en ésta investigación muestran una mayor concentración de ácido acético cuando no hay producción de hidrógeno (a 35C y un TRH de 12h), que cuando se produce hidrogeno (a 35C y un TRH de 6h). La explicación esta relacionada con la existencia de las bacterias homoacetogénicas, principalmente clostridio homoacetogénicas, las cuales crecen heterotróficamente mediante la conversión de azúcar simple a acetato sin la producción de hidrógeno (Eq.

(1)). Adicionalmente las bacterias clostridio homoacetogénicas son capaces de crecer autotróficamente con la producción de acetato y una mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono como única fuente de energía (Eq. (2)). Basado en las ecuaciones 1 y 2, la concentración del ácido acético durante la fermentación se podría aumentar.



4.5.6. Influencia del TRH sobre la velocidad específica de producción de hidrógeno

A partir de los resultados obtenidos en las cinéticas de producción de hidrógeno a 25 y 35°C con TRH de 6 y 12h se evaluó la producción de hidrógeno en función del TRH (ver figura 4.9), adicionalmente se calculó la velocidad específica de producción de hidrógeno (VEPH) en función del TRH (ver tabla 4.15). Los resultados evidencian que el TRH tiene una clara influencia sobre la VEPH. A menor TRH es mayor la VEPH, así mismo se puede concluir que a temperaturas mesofílicas (35°C) se obtiene una mayor VEPH que a bajas temperaturas (25°C). En la tabla 4.14 se presentan los valores calculados de la VEPH en relación con el TRH, al comparar los resultados obtenidos a 35°C con un TRH de 6 y 12h, se observa que al operar el reactor SBR con un TRH de 6 h se obtiene una VEPH tres veces mayor que la lograda a 12 h. Es importante aclarar que la VEPH se calculó durante la producción máxima exponencial del biogás. Los resultados representan el promedio de cuatro cinéticas, una vez se logró la estabilidad del reactor. Se utilizó el valor máximo de hidrógeno detectado en la composición el biogás, para cada una de las pruebas.

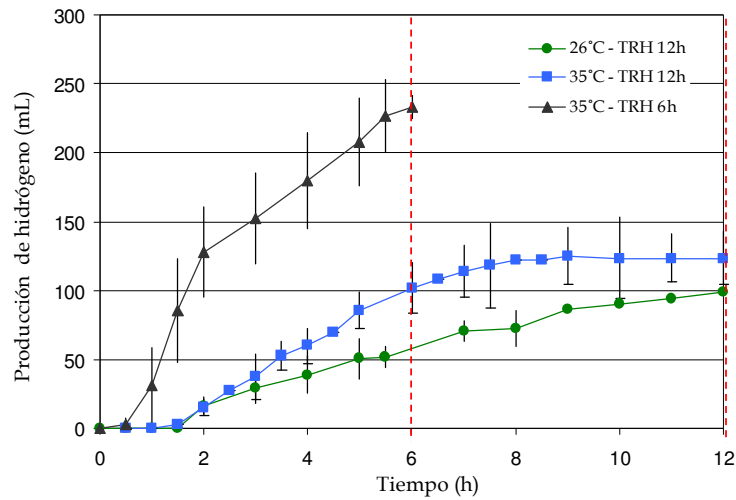


Figura 4.10 Producción de hidrógeno en función del TRH

Tabla 4.14. VEPH en función del TRH

Condiciones Operacionales	VEPH
35°C - TRH 12h	5.70mL H ₂ /gSSV-h
35°C-TRH 6h	16.34 mL H ₂ /gSSV-h
25°C-TRH 12h	1.21 mL H ₂ /gSSV-h
25°C-TRH 6h	No se observó desplazamiento de agua

4.6. Conclusiones parciales

Es factible producir hidrogeno a partir de las aguas residuales de la industria tequilera, las mejores condiciones encontradas en esta investigación, se obtuvieron a 35°C, TRH de 6h, pH de 5.5 y carga orgánica de 5 g/L.

Los bajos resultados en la tasa máxima de producción de hidrógeno están asociados con la presencia de bacterias metanogénicas afectando la eficiencia en la producción de hidrógeno.

Los resultados muestran un cambio en el consorcio microbiano, poniendo en cuestión los reportes de la literatura respecto a los requerimientos de pH de los procesos

metanogénicos, que establecen como rango de operación valores entre 6.6 y 7.6. Según la literatura valores fuera de este rango pueden ser perjudiciales para el proceso, y valores inferiores a 6 pueden inhibir a los microorganismos y suspender la generación de metano. Se comprobó que las bacterias metanogénicas pueden llegar a sobrevivir en pH ácidos.

La reducción del TRH a 6 h fue favorable para la producción fermentativa de hidrógeno a partir de la degradación de las aguas de la industria tequilera, inhibiendo el crecimiento de las bacterias metanogénicas (consumidoras de hidrógeno).

A 25°C y un TRH de 6 h se observó que la cantidad de biogás generado no fue suficiente para lograr el desplazamiento de agua en el dispositivo Mariotte, evidenciando que las bajas temperaturas no favorecen la producción biológica de hidrógeno cuando se trabaja con sustratos complejos.

Los resultados demostraron que a menor TRH es mayor la velocidad específica de producción de hidrógeno VEPH; así mismo se puede concluir que a temperaturas mesofílicas (35°C) se obtiene una mayor VEHP que a temperatura ambiente (25°C).

Capítulo 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El principal aporte de esta investigación fue encontrar las mejores condiciones para hacer factible la producción biológica de hidrógeno a partir de las aguas residuales de la industria tequilera. Se demostró que un TRH de 6h y temperatura de 35°C son condiciones favorables para la producción de hidrógeno ya la selección de bacterias productoras de hidrógeno, mejorando la eficiencia del proceso.

Las pruebas de actividad anaerobia mostraron que la temperatura inicial de aclimatación del inóculo no influye sobre la temperatura adecuada para la producción de hidrógeno en términos de concentración ni velocidad específica de producción de hidrógeno.

Se encontró que no existe una diferencia notoria en la producción de hidrógeno, en condiciones mesofílicas y termofílicas, lo que sugiere que para un mismo inóculo pueden existir dos temperaturas óptimas, una para cada intervalo, para la producción de hidrógeno. No obstante los resultados muestran una mayor velocidad específica de producción de hidrógeno más alta en temperaturas mesofílicas.

Las temperaturas termofílicas son poco favorables para la conversión de energía, dado que se requiere invertir una mayor cantidad de energía para aumentar la temperatura en 20°C, (pasando de 35 a 55°C) y obtener tan solo un 15% más de H₂. Adicionalmente, en termofilia se presentan un mayor tiempo de latencia y velocidades específicas de producción de hidrógeno más bajas. Por lo tanto para que exista un balance entre la

producción de hidrógeno y el uso moderado de energía es conveniente operar los reactores biológicos en un rango de temperaturas mesofílicas.

En las pruebas realizadas en el reactor SBR, se demostró que TRH elevados (12 horas) o bajas tasas de dilución, favorecen la presencia de bacterias metanogénicas afectando la eficiencia en la producción de hidrógeno. A pesar de que el reactor se mantuvo en condiciones ácidas (pH 5.5) que en principio no son favorables para el crecimiento de las bacterias metanogénicas, estas pudieron reproducirse y generar metano.

La metanogénesis fue observada a pesar de que en el proceso de selección de las bacterias productoras de hidrógeno, se inhibe a las bacterias metanogénicas. Es muy probable que las aguas de la industria tequilera contuvieran bacterias metanogénicas que prevalecieron en el medio., cuando el reactor fue alimentado con glucosa, no se detecto metano en el biogás. Lo anterior implica que al usar aguas residuales reales la robustez del reactor se debe incrementar.

Es viable producir hidrógeno a partir de las aguas residuales de la industria tequilera. las mejores condiciones encontradas en esta investigación fueron a 35°C, pH de 5.5 y TRH 6 h, obteniendo una fracción de máxima de hidrógeno en el biogás de 40% con un intervalo promedio de 19 a 33%, una velocidad específica de producción de hidrógeno de 12.38 mL H₂/gSSV-h y una VVPH de 58 mL/L-h. Siendo buenos resultados teniendo en cuenta que las vinazas son aguas inhibitorias que contienen compuestos tóxicos para los microorganismos.

RECOMENDACIONES

Con los resultados de este estudio se sugiere operar los reactores biológicos en un rango de temperaturas mesofílicas, quedando pendiente realizar más investigación respecto a las temperaturas termofílicas y su viabilidad en la producción de hidrógeno.

El seguimiento a la comunidad microbiana y el crecimiento selectivo de organismos productores de hidrógeno podrían mejorar los resultados obtenidos en esta

investigación, en tal sentido, se sugiere que futuras investigaciones estén orientadas al estudio estructura y características de la comunidad microbiana presente en el reactor.

Capítulo 6

REFERENCIAS

American Public Health Association, AWWA and WPCF (1992). Standard Methods for the examination of water and wastewater. 18th Ed. Greenberg, A.E., Clesceri A.E., Eaton, A.D. (Eds), American public Health Association, Washington D.C.

Argun H., Kargi F., Kapdan I. K. (2009). 6s Microbial culture selection for bio-hydrogen production from waste ground wheat by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (5), 2195-2200.

Buitrón G., Moreno-Andrade I., Pérez J., Betancur M.J., Moreno J.A. (2006). Optimal biodegradation of phenol and municipal wastewater using a controlled sequencing batch reactor. *Water Science & Technology*, 54, 273-280.

Buitrón G., Schoeb M-E , Moreno J. (2003). Automated sequencing batch biorreactor under extreme peaks of 4 - Chlorophenol. *Water Science Technology*, 47 (10), 175- 181.

Buitrón G., Moreno J. (2004). Modeling of the acclimation/deacclimation processes of a mixed culture degrading 4 - chlorophenol. *Water Science Technology*, 49 (1), 79-86.

Buitrón G., Moreno G. (1997). Influence of So/Xo ratio and medium composition on anaerobic biodegradability test. 52nd Purdue University Industrial Waste Conference Proceedings, 125-133.

Cheong D.Y., Hansen C.L. (2006). Acidogenesis characteristics of natural, mixed anaerobes converting carbohydrate - rich synthetic wastewater to hydrogen. *Process Biochem.* 41, 1736 - 1745.

Chin-Chao C, Hong-Pin C, Jou-Hsien W., Chiu-Yue L.(2008) Fermentative hydrogen production at high sulfate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1573 - 1578.

Chun-Feng C., Yu-You L., Kai-Qin X., Yoshitaka E., Yuhei I., Hai-Nan K. (2008). A pH- and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4739 - 4746.

- Collet C., Adler N., Schwitzguébel J.P., Péringer P. (2004). Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29,1479–1485.
- Dávila-Vázquez, Razo-Flores E. (2007). Producción biológica de hidrógeno por vía fermentativa: fundamentos y perspectivas. *Biotecnología*. Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería 11(3), 19 - 27.
- Dong-Hoon K., Sang-Hyoun K., Hang-Sik S. (2009). Sodium inhibition of fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34 (8), 3295-3304.
- Evvyernie D., Morimoto K., Karita S., Kimura T., Sakka K., Ohmiya K. (2001). Conversion of chitinous waste to hydrogen gas by *Clostridium paraputrificum* M-21, *J Biosci Bioeng.* 91, 339 - 343.
- Fabiano B., Perego P. (2002). Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*, *Int J Hydrogen Energy*, 27, 149–156.
- Fan K-S, Kan N-R, Lay J-J. (2006a). Effect of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenesis in CSTR. *Bioresource Technol.*, 97, 84–89.
- Fan Y-T, Zhang G-S, Guo X-Y, Xing Y., Fan M-H. (2006b). Biohydrogen-production from beer lees biomass by cow dung compost. *Biomass and Bioenergy*, 30, 493–496.
- Fang H.H.P., Liu H. (2002a). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture, *Bioresource Technol.*, 82, 87–93.
- Fang H.H.P.,Liu H. (2002b). Hydrogen production from wastewater by acidogenic granular sludge. *Water Sci. & Technol.*, 47, 153-158.
- Fang, H.H.P., Zhang T., Liu H. (2002c). Microbial diversity of mesophilic hydrogen producing sludge. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58, 112- 118.
- Gavala H. N., Skiadas I. V., Ahring B. K. (2006). Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31 (9), 1164-1175.
- Gavala H. N. Angelidaki I. and Ahring B. K. (2003). Kinetics and Modeling of Anaerobic Digestion Process. *Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology*, Vol. 81.
- Gadhamshetty V., Johnson D.C., Nagamany Nirmalakhandan N., Geoff B. Smith G.B., Shuguang Deng S. (2009). Dark and acidic conditions for fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 821– 826.
- Hallenbeck P. (2009). Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy* doi:10.1016/j.ijhydene.2008.12.080.

- Han S-K., Shin H-S. (2004). Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 569 – 577.
- Hawkes F.R., Hussy I., Kyazze G., Dinsdale R., Hawkes D.L.(2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(2) 172-184.
- Janssen M. G. J., Lindblad P., van Niel E. W. J, Reith J. H., Wijffels R. H. (2002). Biohydrogen 2002. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27 (11-12), 1123-1124.
- Kapdan I. Kargi F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 569-582.
- Kitts D.D., Wu C.H., Stich H.F., Powrie W.D. (1993). Effect of glucose-lysine maillard reaction products on bacterial and mammalian cell mutagenesis. *J. Agric. Food Chem.* 41, 2353-2358.
- Kumar N., Das D. (2000). Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08, *Process Biochem.*, 35 , 589–593.
- Kuo-Shing L., Yung-Sheng L., Yung-Chung L., Ping-Jei L., Jo-Shu C. (2004). Operation strategies for biohydrogen production with a high-rate anaerobic granular sludge bed biorreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 35 (6-7), 605-612.
- Lalit Babu V., Venkata Mohan S., Sarma P.N. (2009). Influence of reactor configuration on fermentative hydrogen production during wastewater treatment, *International Journal of Hydrogen Energy*, doi:10.1016/j.ijhydene.2009.02.011
- Lay J-J. (2001). Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. *Biotechnology Bioeng.*, 74, 280-287.
- Lay J-J. (2000). Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnol Bioeng.*, 68, 269–278.
- Lay J-J., Lee Y-J., Noike T. (1999). Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid. *Waste. wat. Res*, 33(11), 2579 – 2586.
- Lee Z-K., Li S-L., Lin J-S., Wang Y-H., Kuo P-C., Cheng S-S. (2008). Effect of pH in fermentation of vegetable kitchen wastes on hydrogen production under a thermophilic condition. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 5234 – 5241
- Lee K-S, Lin P-J y Chang J-S. (2006). Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 465- 472.
- Lin C-Y, Chung W-C, Hung C-H. (2007). Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, accepted 3 September 2007.

- Lin C.Y., Lay C.H. (2004). Carbon/nitrogen ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 41-45.
- Lin C-Y, Chang R-C. (2004). Fermentative hydrogen production at ambient temperature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 715 - 720.
- Linerio J., Guzman A. (2004). Tratamiento de Efluentes y Aprovechamiento de Residuos en *Ciencia y Tecnología del Tequila Avances y Perspectivas*. CIATEJ A.C. Guadalajara, Jalisco, México 259-281
- Liu G. and Shen J. (2004). Effects of culture medium and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. *J Biosci Bioeng.*, 98, 251-256
- Lloyd T. A., Wyman Ch. E. (2005). Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids, *Bioresource Technology*, 96, 1967-1977.
- Naike T., Ko I.B., Yokoyama S., Kohno Y., Li Y.Y. (2005). Continuous hydrogen production from organic waste. *Water Science and Technology*, 52 (1-2), 145-151
- Nan-Qi R., Wan-Qian G., Xiang-Jing W, Wen-Sheng, Bing-Feng L., Xing-Zu W., Jie D., Zhao-Bo C. (2008). Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4318- 4324.
- Madigan M.T., Martinko J. M. and Parker J. (2003). Brock Biology of Microorganisms. Tenth edition. Prentice Hall.
- 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.*, 73, 59-65.
- Montes-Moncivais A., Moreno G., Buitrón G. (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.
- Montes-Moncivais A., Moreno G., Buitrón G. (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.
- Moreno-Andrade I., Buitrón G. (2004a). Influence of the origin of the inoculum on the anaerobic biodegradability test. *Water Science & Technology*, 49 (1) 53-59
- Moreno-Andrade I., Buitrón G. (2004b). Variation of the microbial activity during the acclimation phase of a SBR system degrading 4-chlorophenol. *Water Science and Technology*, 50, (10), 251- 258.

- Mu Y, Yu HQ, Wang G. (2007). Evaluation of three methods for enriching H₂-producing cultures from anaerobic sludge. *Enzyme Microb Technol*,40(4), 947-953.
- Nakashimada Y., Rachman M.A., Kakizono T. and Nishio N. (2002). Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states, *Int J Hydrogen Energy* **27**, 1399-1405.
- Rittmann Bruce E., McCarty Perry L. (2001). *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. Mc Graw Hill.
- Shin H-S., Younb J-H., Kim S-H. (2004). Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy* **29** 1355 - 1363
- Shu-Yii W, Chun-Hsiung H, Chiu-Yue L., Ping-Jei L., Kuo-Shing L, Chi-Num L., Fang-Yuan C., Jo-Shu C. (2008). HRT-dependent hydrogen production and bacterial community structure of mixed anaerobic microflora in suspended, granular and immobilized sludge systems using glucose as the carbon substrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**, 1542 - 1549
- Sirianuntapiboon S., Somchai P., Ohmomo S., Attampasampunna P. (1988). Screening of filamentous fungi having the ability to decolourize molasses pigments. *Agr. Biol. Chem.* **52**, 387-392.
- Sompong O-T., Poonsuk P., Nugul I, Srisuda D., Nils-Kare B. (2007). Improvement of biohydrogen production and treatment efficiency on palm oil mill effluent with nutrient supplementation at thermophilic condition using an anaerobic sequencing batch reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, **41**, 583-590.
- Tanisho S., Shiwata Y. (1994), Continuous hydrogen production from molasses by bacterium *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, **19**, 807-812.
- Taguchi F., Mizukami N., Saito-Taki T. y Hasegawa K. (1995). Hydrogen production from continuous fermentation of xylose during growth of *Clostridium* sp. Strain no. 2, *Canadian. Journal of Microbiology*, **41**, 536-540.
- Torrijos M., Sousbie P., Moletta R., Delgenes J.-P. (2004). High COD wastewater treatment in anaerobic SBR: treatment of effluent from a small farm goat's cheese dairy. *Water Sci. Technol.*, **50** (10), 235 - 242
- Van Ginkel S, Logan B. (2005). Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. *Environ Sci Technol.*, **39**, 9351-9356.
- van Groenestijn J. W., Hazewinkel J. H. O., Nienoord M., Bussmann P. J. T. (2002). Energy aspects of biological hydrogen production in high rate biorreactors operated in the thermophilic temperature range. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27** (11-12), 1141-1147.

Vargas A, Moreno J, Mendoza I. (2009). Development of an Automated Anaerobic Biodegradability Testing Device. *Instrumentation Science & Technology*, 37 (1), 40-49.

Valdez-Vazquez, I., Poggi-Varaldo, H.M. (2008). Hydrogen production by fermentative consortia, *Renew Sustain Energy Rev* doi:10.1016/j.rser.2008.03.003.

Valdez-Vazquez I., Ríos-Leal E., Esparza-García F., Cecchi F., Poggi-Varaldo H.M (2005a). Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30, 1383 – 1391.

Valdez-Vazquez I., Sparling R., Risbey D, Rinderknecht-Seijas N, Poggi-Varaldo H.M. (2005b). Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastes. *Bioresource Technology*, 96, 1907–1913.

Wan-Qian G., Nan-Qi R., Xiang-Jing W., Wen-Sheng X., Zhao-Hui M., Jie D., Yuan-Yuan Q., Lu-Si Z. (2008). Biohydrogen production from ethanol-typefermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4981 – 4988.

Wang J., Wan W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 799 – 811.

Wang J., Wan W. (2008). Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen -producing cultures from digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 2934 – 2941.

Wedzicha B.L., Kaputo M.T. (1992). Melanoidins from glucose and glycine: composition, characteristics and reactivity towards sulphite ion. *Food Chem.* 43, 359-367.

Wen-Hsing C., Shihwu S., Shen-Yi C. (2009). Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 227-234.

Yang P., Zhang R., McGarvey J. A., Benemann J.R. (2007). Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 4761 – 4771.

Yang H., Shao P., Tingmao Lu T., Shen J., Wang D., Xu Z., Yuan X. (2006). Continuous bio-hydrogen production from citric acidwastewater via facultative anaerobic bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 1306 – 1313.

Yokoi H., Saito A.S., Uchida H, Hirose J., Hayashi S., Takasaki Y. (2001). Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue. *J Biosci Bioeng.*, 91, 58–63.

Yokoi H., Tokushige T., Hirose J., Hayashi S. and Takasaki Y. (1998). H₂ production from starch by mixed culture of *Clostridium buytricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnol Lett*, 20, 143–147.

Yu H, Zhu Z, Hu W, Zhang H. (2002). Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27,1359-1365.

Zhang, T., Liu, H. y Fang, H.H.P. (2003). Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *Journal of Environmental Management*, 69 (2), 149-156.

Zhu H., Stadnyk A., Beland M., Seto P. (2008) Co-production of hydrogen and methane from potato waste using a two-stage anaerobic digestion process. *Bioresource Technology*, 99, 5078-5084.

Anexo 1

Técnicas analíticas

1. Demanda química de oxígeno

Fundamento

La demanda química de oxígeno DQO, corresponde a la cantidad de oxígeno requerida para oxidar completamente por medios químicos los compuestos orgánicos a CO_2 y H_2O . En la práctica, la materia orgánica en el agua es oxidada por el dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) bajo condiciones estrictas (ácido sulfúrico concentrado, y una temperatura de $150\text{ }^\circ\text{C}$). La cantidad de oxígeno del dicromato usado, es determinada y expresada como DQO.

Una importante ventaja de este método es que cuantifica la materia orgánica disuelta y particulada, considerando el hecho que el tratamiento de aguas residuales tiene que ver con la separación de ambos tipos de materia orgánica, la DQO es ampliamente usada como un parámetro cuantitativo.

Procedimiento

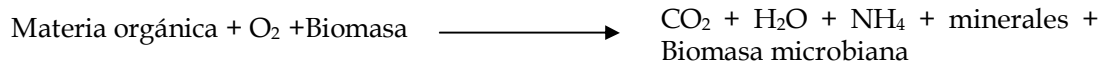
Para su determinación se utilizaron tubos HACH con dicromato de potasio y ácido sulfúrico en un rango de 0 - 1500 mg DQO/L. A cada vial se le adicionaron 2 mL de la muestra utilizando una dilución de 1 en 100 y 1 en 1000. Dado que la reacción es exotérmica es importante mezclar cuidadosamente de lado a lado del tubo para evitar así un calentamiento local en el fondo de la celda y una posible reacción explosiva.

Se colocaron los tubos dentro del reactor HACH precalentado a una temperatura de $150\text{ }^\circ\text{C}$, se efectuó la digestión por 2 horas. Después de las 2 horas se apagó el reactor y los tubos se dejaron enfriar por 20 minutos. De nuevo se mezcló la solución, invirtiendo los tubos cuidadosamente y se leyeron en el espectrofotómetro HACH a 620 nm. Se tomaron muestras por triplicado y se utilizó un blanco agregando a un tubo HACH 2 mL de agua destilada. El resultado obtenido está en unidades de mgO_2/L .

2. Demanda bioquímica de oxígeno

Fundamento

La demanda bioquímica de oxígeno, DBO, se define como la cantidad de oxígeno usado por los microorganismos no fotosintéticos a una temperatura de 20°C, para metabolizar los compuestos orgánicos degradables biológicamente y el oxígeno requerido para oxidar la materia inorgánica como sulfuros y hierro ferroso.



El nitrógeno libre en la forma de hidróxido de amonio, es susceptible de oxidación en presencia de oxígeno, pasando a nitrato. Para obtener un resultado estable y reproducible, el oxígeno consumido es medido durante un periodo de cinco días. Durante los primeros dos días, los microorganismos rápidamente metabolizan los compuestos orgánicos disponibles y viables de degradar biológicamente. Tales cinéticas son obtenidas en condiciones ambientales adecuadas, como:

- pH neutro
- Presencia de un inóculo activo
- Presencia de una cantidad apropiada de nutrientes minerales necesarios para el crecimiento microbiano (de particular importancia son N, P, Ca, Mg, Fe, S).
- Incubación en la oscuridad.

Procedimiento

El Método Respirométrico para la determinación de la DBO₅ se basa en medir el consumo de oxígeno, o la producción de CO₂, en una botella respirométrica para la determinación de la DBO₅, se calcula la diferencia entre el oxígeno disuelto en la muestra o en una dilución de la misma, entre el día 0 y el día 5.

Se utilizaron botellas Winkler de 300 mL, se realizó una dilución 1/100 y se trabajó en un rango de cuatro concentraciones de 1, 2, 3, 5 mL de muestra completando con agua de dilución a un volumen total de 300 mL, y un blanco sin muestra, llenado con agua de dilución. La adición de agua de dilución asegura la disponibilidad de nutrientes y oxígeno durante el periodo de incubación.

Agua de dilución

Dependiendo del número de muestras que se vayan a preparar, se toma un volumen adecuado de agua destilada, se airea hasta llegar a la saturación (aproximadamente en 4 h), se adicionan los nutrientes (ver tabla 2.1) y sobrenadante de un consorcio microbiano aerobio de un sistema de tratamiento de aguas residuales en una concentración de 2 mL/L.

Tabla 2.1 Soluciones para la DBO₅

Solución buffer de fosfatos	
KH ₂ PO ₄	8.5 g/L
K ₂ HPO ₄	21.75 g/L
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	33.4 g/L
NH ₄ Cl	1.7 g/L
Solución de Sulfato de Magnesio	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	22.5 g/L
Cloruro Férrico	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.25 g/L
Cloruro de Magnesio	
CaCl ₂	27.5 g/L

Las muestras se incubaron a 20°C y para cada dilución se realizaron 3 mediciones de oxígeno disuelto utilizando el método winkler, como se describe a continuación:

Medición de oxígeno disuelto, Metodo Winkler

A la muestra, cuidadosamente tomada en una botella Winkler, se le adiciona 1 mL de sulfato manganeso (Reactivo 1) y 1 mL de Alkali-yoduro-azida (Reactivo 2). Posteriormente se tapan cuidadosamente evitando la entrada de burbujas de aire en su interior, se agitan las botellas para homogenizar los reactivos.

Las muestras que contienen oxígeno formaran rápidamente un precipitado color marrón, tanto más abundante como mayor sea la concentración de oxígeno en la muestra. A su vez, las muestras que no contienen oxígeno formaran un precipitado blanco de hidróxido manganeso, Mn(OH)₂. Una vez el precipitado marrón haya sedimentado, al menos hasta la mitad de la altura de la botella, se adiciona 1 mL de

ácido sulfúrico concentrado (Reactivo 3), se tapa nuevamente la botella y se homogeniza hasta la disolución total del precipitado marrón.

La tonalidad amarillo-quemado que se obtiene se debe al yodo que se ha formado, en una cantidad equivalente al oxígeno contenido en la muestra. El paso final consiste en la titulación del yodo con una solución de tiosulfato de sodio.

Se toma entonces una alícuota de 100 mL de la botella Winkler y se titula con una solución de tiosulfato de sodio $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.02N, hasta que la coloración amarilla se torne muy tenue. En este punto de la titulación, se adiciona a la mezcla reaccionante unas gotas de solución indicadora de almidón y se continua titulando hasta la desaparición de la coloración azul.

A partir de la titulación, se determina la concentración de oxígeno disuelto mediante la ecuación:

$$DBO_5, mg / L = \frac{(D_1 - D_2) - (S)}{V_B * P}$$

Donde:

D_1 = Oxígeno disuelto de la muestra diluida inmediatamente después de su preparación, mg/L.

D_2 = Oxígeno disuelto de la muestra después de 5d de incubación a 20°C, mg/L.

S = mL de muestra adicionado en cada botella

V_B = Volumen de la botella

P = Fracción volumétrica decimal de la muestra usada, 1/P = Factor de dilución.

3. Sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos

Para la determinación de los sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos se preparó el filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/A), enjugándolo con agua destilada y aplicando vacío en el embudo de filtración, hasta eliminar totalmente el agua en exceso. Se dejó secar en estufa a 103-105°C por 1 hora, se dejó enfriar en el desecador por 15 min y luego se peso en la balanza analítica.

Una vez que se obtuvo el peso constante del filtro, se colocó en el embudo de filtración y se mojó el filtro con una pequeña cantidad de agua destilada. Se tomó un volumen de 5 mL de la muestra homogeneizada, vertiendo el volumen en el embudo de filtración y se aplicó vacío hasta eliminar totalmente el exceso de agua. Usando un soporte de aluminio se llevó a secar a la estufa a 105°C por 1 hora, se dejó enfriar en el desecador durante 15 min y se registró su peso, obteniendo así los datos para el cálculo de los sólidos suspendidos totales.

Para calcular los sólidos suspendidos fijos se colocó el filtro anterior en la mufla a 550 ± 50°C durante 15 min, se dejó enfriar en el desecador por 15 min y se registró su peso. Los sólidos suspendidos volátiles se determinan por la diferencia entre sólidos totales y fijos.

Cálculos

$$SST, mg / L = \frac{(P_e - P_c) * 1000}{V}$$

$$SSF, mg / L = \frac{(P_m - P_c) * 1000}{V}$$

$$SSV, mg/L = SST - SSF$$

donde:

SST = sólidos suspendidos totales en mg SST/L

SSF = sólidos suspendidos fijos en mg SSF/L

SSV = sólidos totales volátiles en mg SSV/L

Pc = Peso constante del filtro en mg.

Pe = Peso del filtro con el sólido seco a 103-105°C en mg.

Pm = Peso de la filtro más el residuo calcinado a 550 °C en mg.

V = volumen de muestra en mL.

4. Determinación fracción mol de H₂ y CO₂

Fundamento

El proceso de separación de gases por cromatografía consiste en hacer pasar el analito (gas o líquido volátil), en forma gaseosa a través de la columna, arrastrado por un gas acarreador. La muestra del líquido o gas se inyecta a través de un septo, en un inyector caliente, en cuyo interior la muestra se evapora rápidamente. El vapor es arrastrado a través de la columna por el gas portador (He, Ne o N₂) y los analitos después de separados llegan al detector cuya respuesta aparece en la pantalla de una computadora. La columna debe estar lo suficientemente caliente para que los analitos alcancen una presión de vapor adecuada y fluyan en un tiempo razonable. El detector se mantiene a una temperatura más elevada que la columna, de forma que los analitos se encuentren en forma gaseosa.

5. Ácidos grasos volátiles y solventes

Fundamento

Los ácidos grasos volátiles libres de cadena corta son productos intermedios de la degradación anaerobia de la materia orgánica. Generalmente, en la producción de hidrógeno los ácidos acético y butírico están en concentraciones más altas que los demás ácidos grasos. Si los AGV están presentes en altas concentraciones pueden causar estrés microbiano, por lo que la concentración de AGV, es un factor importante en la operación de un reactor anaeróbico.

Anexo 2

Validación de técnicas analíticas AGV y solventes

1. Etanol

Componente	[] (ppm)	Tiempo de retención (min)	Area	Area %	Límite de detección estadístico (ppm)
Etanol	20	0.23	3073 ± 80	7.197	6.06
	40	0.24	5518 ± 136	12.925	
	60	0.23	8193 ± 188	19.191	
	80	0.24	11591 ± 2	27.150	
	100	0.24	14317 ± 656	33.536	

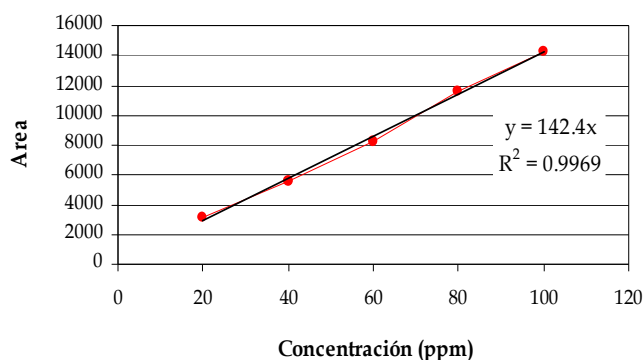


Figura 1. Curva de calibración etanol

2. Acetona

Componente	[] (ppm)	Tiempo de retención (min)	Area	Area %	Límite de detección estadístico (ppm)
Acetona	20	0.39	2528 ± 226	7.113	6.96
	40	0.40	4750 ± 42	13.365	
	60	0.40	6695 ± 8	18.839	
	80	0.40	9627 ± 69	27.089	
	100	0.40	11938 ± 124	33.594	

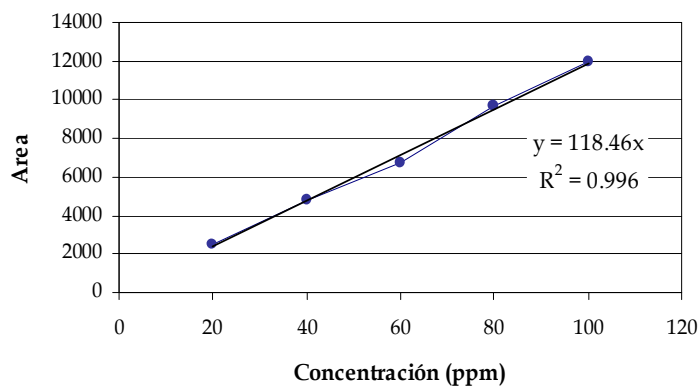


Figura 2. Curva de calibración acetona

3. Ácido acético

Componente	[] (ppm)	Tiempo de retención (min)	Area	Area %	Límite de detección estadístico (ppm)
Acético	20	5.93	1222 ± 206	8.494	14.45
	40	5.95	2174 ± 547	15.118	
	60	5.96	2665 ± 578	18.532	
	80	5.97	3910 ± 238	27.190	
	100	5.98	4410 ± 356	30.667	

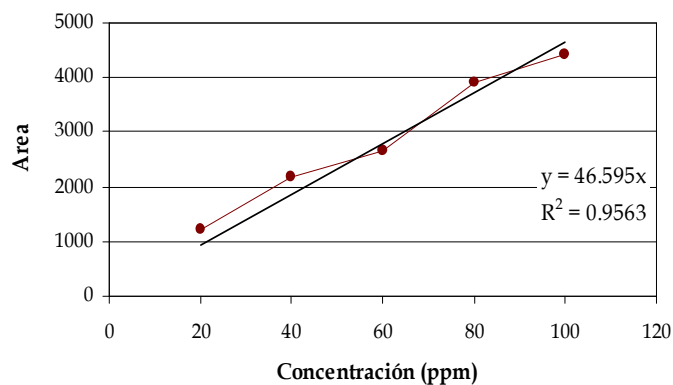


Figura 3. Curva de calibración ácido acético

4. Ácido propiónico

Componente	[] (ppm)	Tiempo de retención (min)	Area	Area %	Límite de detección estadístico (ppm)
Propiónico	20	7.05	1848 ± 40	7.727	10.23
	40	7.06	3143 ± 100	13.145	
	60	7.07	4498 ± 21	18.811	
	80	7.09	6624 ± 135	27.701	
	100	7.10	7799 ± 52	32.617	

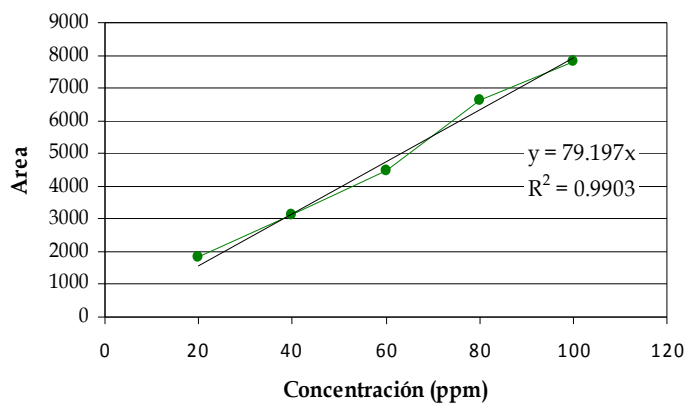


Figura 4. Curva de calibración ácido propiónico

5. Ácido isobutírico

Componente	[] (ppm)	Tiempo de retención (min)	Area	Area %	Límite de detección estadístico (ppm)
Isobutírico	20	7.38	2452 ± 83	8.032	11.77
	40	7.40	3975 ± 78	13.022	
	60	7.41	5668 ± 68	18.571	
	80	7.42	8450 ± 196	27.684	
	100	7.44	9978 ± 312	32.691	

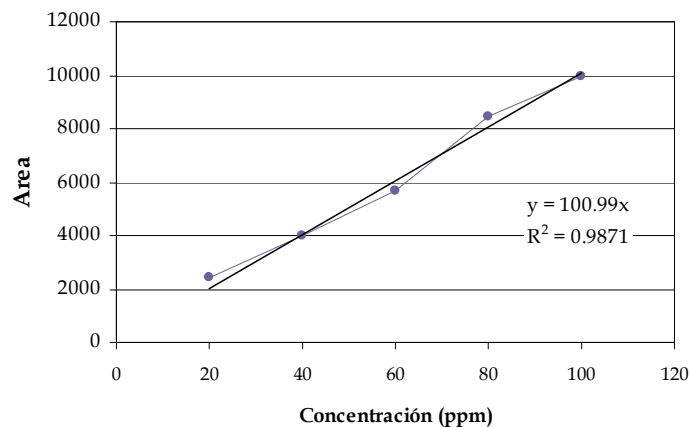


Figura 5. Curva de calibración ácido isobutírico

6. Ácido butírico

Componente	[]	Tiempo de retención (min)	Area	Area %	Límite de detección estadístico (ppm)
Butírico	20	8.21	1818 ± 643	6.401	9.65
	40	8.21	3791 ± 177	13.348	
	60	8.24	5380 ± 4	18.943	
	80	8.24	8029 ± 151	28.270	
	100	8.26	9383 ± 160	33.038	

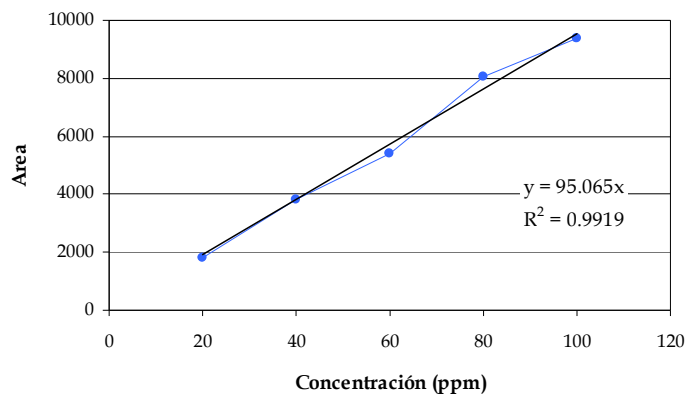


Figura 6. Curva de calibración ácido butírico

Anexo 3

Reconocimientos y publicaciones

Reconocimientos

Segundo lugar. Expociencias Bajío, Querétaro 2008 categoría área: Tecnologías y Ciencias del Medio Ambiente. Santiago de Querétaro, Querétaro. Septiembre 11 al 13 de 2008.

Primer lugar. Expociencias Nacional 2008 categoría: Medio Ambiente. Tehuacán, Puebla. Noviembre 23 al 25 de 2008

Publicaciones

Carolina Carvajal y Germán Buitrón (2008). Efecto de la temperatura sobre el inóculo utilizado para la producción fermentativa de hidrógeno Modalidad Oral. V Simposium Internacional sobre Bioprocesos más Limpios y Desarrollo Sustentable.- Energías Limpias. Xalapa, Veracruz, México del 5 al 10 de octubre de 2008.

Carolina Carvajal Monroy, Germán Buitrón Méndez (2009) Producción de Hidrógeno a partir de Efluentes de la Industria Tequilera. Modalidad Oral. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. Acapulco Guerrero, México, del 21 al 26 de junio.

Carolina Carvajal, Germán Buitrón (2009) Biohydrogen production from tequila's vinasses using a sequencing batch reactor (SBR) to be submitted to International Journal of Hydrogen Energy.

Carolina Carvajal, Jaime Pérez, Germán Buitrón (2009) Influence of the origin of the inoculum and temperature on fermentative hydrogen production to be submitted to Bioresource Technology.