

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL**



**Evaluación de las variaciones de pH en la fermentación oscura de celulosa
para la producción de hidrógeno como fuente alterna de energía.**

Presenta

David Eduardo Pecina Chacón

**Como Requisito Parcial para Obtener el Grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Ingeniería Ambiental**

Octubre de 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL**



**EVALUACIÓN DE LAS VARIACIONES DE PH EN LA
FERMENTACIÓN OSCURA DE CELULOSA PARA LA
PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO COMO FUENTE ALTERNA DE
ENERGÍA.**

PRESENTA

DAVID EDUARDO PECINA CHACÓN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA
AMBIENTAL**

OCTUBRE DE 2016

RESUMEN

El hidrógeno (H_2) es un vector energético de interés especial desde el punto de vista ambiental debido a sus propiedades energéticas. Sin embargo, este combustible no se encuentra en forma libre en la naturaleza, por lo que se requiere de desarrollo científico y tecnológico para su producción a gran escala. Los sistemas biológicos son una de las alternativas más atractivas para producir H_2 de forma eficiente y ambientalmente segura. La fermentación oscura, la ruta biológica más atractiva, es capaz de producir H_2 a partir de diferentes compuestos orgánicos. Si bien, esta ruta ha sido ya estudiada en los últimos años, aún existen preguntas por resolver para que la producción H_2 por esta ruta sea considerada una tecnología robusta y pueda implementarse en el futuro a nivel industrial.

Uno de los retos a resolver es la baja estabilidad en el tiempo de reactores fermentadores productores de hidrógeno, y como las comunidades microbianas presentes en estos reactores responden a situaciones de estrés en su entorno, ya sean puntuales y/o continuas, y como estas afectan la productividad y estabilidad en el tiempo. Asimismo, es necesario utilizar sustratos orgánicos abundantes, de bajo costo y con potencial energético, que se ajusten a los requerimientos nutricionales de los microorganismos. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes regímenes de pH sobre la producción de hidrógeno por la fermentación de carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato modelo de materiales lignocelulósicos utilizando consorcios microbianos mixtos.

La primera fase del trabajo consistió en montar reactores anaerobios en lote que se alimentaron con celulosa como principal fuente de carbono, a temperatura constante y a un pH fijo de 5.5. En esta etapa de operación en lote, se logró aclimatar el inóculo para consumir la celulosa y producir H_2 .

En la segunda fase del proyecto, se cambió la operación de los reactores a un modo semicontinuo a un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 5 días. En esta fase se definieron dos condiciones de operación, una de pH fijo (5.5 ± 0.3) y otro de pH variable (5.5 ± 0.3 a 7.0 ± 0.4). Cuando los reactores lograron el periodo estable (coeficiente de

variación < 10 %) se observó que los reactores con pH fijo tuvieron una productividad de biogás de $96 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, mientras que los reactores con pH variable, alcanzaron una productividad promedio de $72 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Por lo que los reactores con pH fijo tuvieron un 25 % más de productividad de biogás. En cuanto a la productividad de H_2 , los reactores con pH fijo produjeron $2.2 \text{ mL}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en contra de $1.1 \text{ mL}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para los reactores con pH variable, los coeficientes de variación fueron de 9 y 10 %, respectivamente. Por lo que, los reactores con pH fijo mostraron ser más eficientes en transformar la celulosa a H_2 y otros productos intermedarios.

DEDICATORIA

A mi familia, que es lo mejor de mi vida.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto CB-2011/168921 “Estudio ecológico y evolutivo de la estructura y funcionalidad de comunidades hidrogenogénicas sometidas a perturbaciones ambientales”.

De la misma manera, se reconoce el apoyo recibido a través del proyecto “Diseño, desarrollo y operación de un reactor biológico para la generación de hidrógeno a partir del tratamiento de aguas residuales de tipo sanitario de origen doméstico, público e industrial” con clave No. 249908 apoyado por el FONDO SECTORIAL CONACYT-SENER-SUSTENTABILIDAD ENERGÉTICA.

AGRADECIMIENTOS

A la administración del Dr. Pedro Leobardo Valdez Tamez por todas las facilidades otorgadas durante la realización de este proyecto de tesis y por el apoyo administrativo durante los cursos del programa de Maestría en Ciencias con orientación en Ingeniería Ambiental.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que a través del programa de becas nacionales me otorgó la beca no. 335155, que como soporte económico y de salud permitió la realización de este trabajo.

Al **Dr. Arquímedes Cruz López** por aceptar la dirección de mi tesis, gracias por todo el apoyo brindado durante las estancias de investigación y la gestión realizada para la conclusión exitosa de este proyecto. Gracias por contribuir a mi formación, no solo académico-científica, sino también de forma integral.

A la **Dra. Idania Valdez Vazquez**, por aceptar participar en la co-dirección de este trabajo. Gracias por su paciencia, enseñanzas y por compartir sus conocimientos conmigo. La admiro por ser una gran investigadora, pero aún más por su gran calidad humana.

Al **Dr. Carlos Eduardo Molina Guerrero**, por aceptar participar como evaluador y revisor del trabajo de tesis, gracias por sus comentarios y por compartir sus experiencias académicas conmigo.

Al **Dr. Germán Buitrón Méndez** en el Instituto de Ingeniería, UNAM, Unidad Académica Juriquilla, por darme todas las facilidades durante mis estancias de investigación. Al **M.B. Jaime Pérez Trevilla** por el apoyo técnico y académico, durante mi estancia en la Unidad Académica Juriquilla.

Al **Dr. Benjamín Limón** por apoyar al desarrollo experimental de este proyecto, al facilitarnos el uso de equipo y espacio del Laboratorio de Ingeniería Ambiental, FIC, UANL. Asimismo, a la **M.I. Lirio Reyna**, por su apoyo y asesoría en diferentes actividades durante la parte experimental del proyecto.

Al **Dr. Gerardo Fajardo San Miguel** por permitirme utilizar las instalaciones y equipos del Laboratorio de Materiales de la Construcción, FIC, UANL.

A mi familia, por su paciencia y amor, cada logro en mi vida se los debo a ustedes. Gracias a mi madre **Josefina Chacón Arredondo** por creer siempre en mí.

A mis amigos, que me han apoyado a lo largo de mis estudios, y que me motivan a seguir adelante, gracias por darme luz en días de oscuridad.

ÍNDICE

RESUMEN.....	vi
DEDICATORIAS.....	vii
AGRADECIMIENTOS.....	viii
ÍNDICE.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv

CAPÍTULO 1.

1.1 INTRODUCCIÓN.....	2
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	5
1.3 HIPÓTESIS.....	7
1.4 OBJETIVOS.....	7
1.4.1 Objetivo general:	7
1.4.2 Objetivos específicos.....	7
1.5 Referencias del capítulo.....	8

CAPÍTULO 2.

2.1 MARCO TEÓRICO.....	12
2.1.1 Energía: situación actual y expectativas futuras.....	12
2.1.2 Política energética en México.....	14
2.1.3 Hidrógeno: sus propiedades y relevancia como portador de energía.....	16
2.1.3.1 Métodos de producción de hidrógeno.....	17
2.1.3.2 Producción biológica de hidrógeno.....	19
2.1.3.3 Producción de hidrógeno por fermentación de azúcares con consorcios microbianos.....	20
2.1.4 Materiales lignocelulósicos como materia prima.....	23
2.1.4.1 Características y abundancia.....	23
2.1.4.2 Degradación natural de la celulosa.....	24
2.1.4.3 Métodos de conversión de celulosa en hidrógeno.....	25
2.2 ANTECEDENTES.....	36
2.2.1 Microorganismos involucrados en la producción de hidrógeno vía fermentación de celulosa.....	27
2.2.2 Factores clave en la producción de hidrógeno vía fermentación.....	28
2.2.3 Producción de hidrógeno con celulosa.....	29
2.3 Referencias del capítulo.....	32

CAPÍTULO 3.

MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
----------------------------------	-----------

3.1 Diagrama general de la etapa experimental.....	39
3.2 Inóculo y sustrato.....	40
3.3 Operación de reactores fermentadores.....	41
3.3.1 Reactores en lote.....	41
3.3.2 Reactores semicontinuos.....	42
3.4 Análisis bioquímicos.....	44
3.4.1 Determinación de pH.....	44
3.4.2 Crecimiento celular.....	44
3.4.3 Consumo de sustrato.....	44
3.4.3.1 Fundamento del método.....	44
3.4.3.2 Preparación y análisis de las muestras.....	45
3.5 Métodos analíticos.....	46
3.5.1 Producción de biogás e hidrógeno.....	47
3.5.2 Caracterización de biogás por cromatografía de gases.....	47
3.5.2.1 Fundamento del método.....	47
3.5.2.2 Preparación y análisis de las muestras.....	48
3.6 Determinación de ácidos orgánicos volátiles (AOV).....	49
3.6.1 Fundamento del método.....	49
3.6.2 Preparación y análisis de las muestras.....	49
3.7 Referencias de capítulo.....	51

CAPÍTULO 4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....54

4.1 Producción de hidrógeno vía fermentación de carboximetil celulosa (CMC).....	54
4.1.1 Operación de reactores en lote.....	54
4.1.1.1 Producción de biogás e hidrógeno.....	54
4.1.1.2 Consumo de sustrato.....	55
4.1.1.3 Crecimiento celular.....	56
4.1.1.4 Producción de ácidos orgánicos volátiles (AOV).....	56
4.1.2 Operación de reactores en modo semicontinuo.....	59
4.1.2.1 Producción de biogás e hidrógeno.....	60
4.1.2.2 Crecimiento celular.....	65
4.1.2.3 Consumo de sustrato.....	67
4.1.2.4 Producción de ácidos orgánicos volátiles (AOV).....	70
4.2 Referencias del capítulo.....	73

CAPÍTULO 5.

CONCLUSIONES.....77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Densidades energéticas de los principales combustibles utilizados.....	16
Tabla 2. Comparación de sistemas de producción de hidrógeno utilizados actualmente....	17
Tabla 3. Comparación de sistemas biológicos para la producción de hidrógeno.....	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Participación de las energías renovables a nivel mundial.....	12
Figura 2. Participación de las energías renovables en México.....	13
Figura 3. Etapas de degradación de la materia orgánica.....	19
Figura 4. Diferentes arreglos estructurales de la celulosa.....	23
Figura 5. Descripción del diagrama de flujo que representa la metodología general de la parte experimental del proyecto.....	39
Figura 6. Estructura química de la carboximetil celulosa (CMC).....	40
Figura 7. Esquema representativo de los reactores en modo de operación semicontinuo...42	
Figura 8. Producción acumulativa de biogás e H ₂ en cada ciclo de operación durante la etapa de operación en lote.....	54
Figura 9. Porcentajes de consumo de sustrato (carboximetil celulosa) al final de cada ciclo de operación de reactores en lote.....	55
Figura 10. Crecimiento en masa celular en términos de SSV al final de los ciclos de operación en reactores en lote.....	56
Figura 11. Producción de ácido orgánico volátiles (AOV's) al final de los tres ciclos de operación en reactores en lote.....	57
Figura 12. Valores de pH durante el período de operación de reactores semicontinuos.....	59

Figura 13. Productividad de biogás en fase de operación semicontinua.....	60
Figura 14. Productividad de hidrógeno y metano. Composición porcentual de hidrógeno y metano en biogás, durante la etapa de operación semicontinua.....	62
Figura 15. Crecimiento celular en la fase de operación semicontinua.....	66
Figura 16. Consumo de CMC durante la fase de operación semicontinua.....	67
Figura 17. Producción de ácidos orgánicos volátiles (AOV's) para el tratamiento de pH fijo y pH variable.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

Mtep	Mega tonelada equivalente de petróleo
GEI	Gases de efecto invernadero
ppm	Partes por millón
Mpa	Mega Pascal
CMC	Carboximetil celulosa de sodio
TRH	Tiempo de retención hidráulico
AOV's	Ácidos orgánicos volátiles
BES	2-Bromoetanosulfonato de sodio
SENER	Secretaría de Energía
AIE	Agencia Internacional de Energía
TCD	Detector de conductividad térmica (por sus siglas en inglés)
FID	Detector de ionización por flama (por sus siglas en inglés)
SEDESOL	Secretaría de Desarrollo Social

CAPÍTULO UNO

1.1 Introducción

1.2 Justificación

1.3 Hipótesis

1.4 Objetivos

1.1 INTRODUCCIÓN

El consumo de energía a nivel mundial para el año 2014 fue de más de 9 mil Mtep, se espera que para el 2040 se incremente en un 56% [1]. Actualmente, los combustibles fósiles cubren el 81 % de la demanda energética a nivel mundial y reportes recientes predicen que lo continuarán haciendo en los próximos años [2-3]. Sin embargo, el uso de estos combustibles tiene consecuencias ambientales adversas como los fenómenos de cambio climático y la contaminación del ambiente a través de sus actividades productivas, además, su disponibilidad futura es incierta y los picos máximos de producción ya se han alcanzado [4]. Asimismo, proyecciones recientes indican que si continúa el actual ritmo de emisiones de gases de efecto invernadero a la atmósfera, se estima que en menos de 40 años se podría alcanzar la concentración de 450 ppm de CO₂ en la atmósfera, punto crítico a partir del cual se presentarían cambios climáticos desfavorables con afectaciones directas sobre los ciclos naturales del planeta [5-6]. Por lo anterior, surge la necesidad de innovar en el desarrollo de energías renovables con la finalidad de incrementar su participación a nivel mundial.

En México, en los últimos años se ha puesto interés sobre los combustibles alternativos a los combustibles fósiles, a partir de la creación de la Ley de Desarrollo y Promoción de los Bioenergéticos en el 2008, y con la nueva Ley de Transición Energética, se han dado pasos en la consolidación de una estrategia energética que permita diversificar las fuentes primarias de energía actuales, con el propósito de asegurar los requerimientos energéticos futuros. Además, es importante destacar los acuerdos internacionales como el Protocolo de Kioto y la Conferencia de las Naciones Unidas 2015, en donde se han formado acuerdo para reducir las emisiones de CO₂.

En este sentido, un elemento clave en la diversificación de fuentes primarias de energía es el hidrógeno (H₂), un vector energético que tiene un rendimiento de 142.45 kJ g⁻¹, se ubica como el combustible con la mayor densidad energética por kilogramo, por encima de la gasolina [7-8]. Además, presenta gran interés debido a que es posible obtenerlo a través de procesos amigables con el ambiente. Es un combustible que puede

contribuir a cubrir la demanda energética de la industria del transporte y puede ser aprovechado a través de su conversión en energía eléctrica.

La producción de H_2 por vías biológicas se logra mediante el uso de procesos metabólicos microbianos que bajo ciertas condiciones, transforman la materia orgánica a productos de valor agregado. De entre estos procesos, el más promisorio es la fermentación oscura, que se lleva a cabo en condiciones de ausencia de luz y oxígeno [9], además, puede utilizar como fuente primaria una gran variedad de compuestos orgánicos, incluso aquellos considerados como residuos [10]. Las ventajas de la fermentación oscura en la producción de H_2 , son bajos requerimientos energéticos, altas tasas de conversión, y que es un proceso con ética ambiental [11-12].

Se han estudiado los principales factores que afectan la producción de H_2 vía fermentación oscura. Diferentes estudios a escala de laboratorio han evaluado factores clave como pH, temperatura, configuración del reactor, tipo de inóculo, entre otros [13-15], lo que ha permitido definir sus efectos sobre la producción de hidrógeno a través de esta vía. Sin embargo, existen retos por resolver previo a la aplicación de esta biotecnología a escalas mayores. Uno de estos retos está en relación con la estabilidad o robustez de reactores fermentadores productores de H_2 en función del tiempo, esto es que se alcancen periodos largos de operación con una producción de H_2 constante.

Diferentes autores han propuesto asociar la falta de estabilidad y robustez con la estructura y funcionamiento de las comunidades microbianas dentro de los reactores fermentadores [16-17], debido a que estas comunidades microbianas presentan una dinámica poblacional en función de las características operativas de dichos reactores, o bien, adaptaciones evolutivas que están en función de las perturbaciones o situaciones de *stress* que puedan presentarse en el período de operación de los reactores, por lo que es de particular interés asociar los efectos de perturbaciones puntuales y/o continuas sobre la productividad y estabilidad de reactores productores de H_2 , en busca de identificar una relación entre la diversidad microbiana y la productividad o estabilidad en la producción de H_2 .

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue promover la diversidad microbiana a través de variaciones periódicas del pH durante la operación de reactores anaerobios semicontinuos y evaluar su efecto en términos de estabilidad y productividad.

En el capítulo 1, se presenta la introducción y justificación del proyecto, así como la hipótesis y los objetivos planteados. En el capítulo 2, se presenta una visión general de los principales conceptos de la producción de H₂ por vías biológicas, y los antecedentes o estudios más sobresalientes. En el capítulo 3, se presentan los procedimientos y metodologías empleados para llevar a cabo la parte experimental. En el capítulo 4, se presentan los resultados experimentales y se hace una discusión de los mismos a través de comparación con trabajos previos a nivel mundial. Finalmente, en el capítulo 5, se presentan las conclusiones a las que se llegó en el proyecto.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Las fuentes energéticas en la actualidad están basadas casi exclusivamente en recursos no renovables. Entre las fuentes más utilizadas se encuentran los combustibles fósiles, como el diesel, el gas natural y el carbón. Estas fuentes, además de tener un futuro incierto, por su naturaleza finita, representan fuentes de emisión de gases de efecto invernadero, que dañan el equilibrio ecológico y tienen efectos directos sobre los ciclos naturales del planeta. Sin embargo, los requerimientos energéticos continuarán en aumento a la par del desarrollo poblacional.

Por este motivo, se deben desarrollar nuevas alternativas que permitan un mayor aprovechamiento del potencial de los recursos naturales renovables, además de las tecnologías que se encuentran ya en desarrollo y que presentan importante potencial como la energía solar y la eólica, se requiere una mayor diversificación de las energías renovables con el fin de superar las limitaciones de intermitencia y almacenamiento.

Un ejemplo de lo anterior, son los materiales lignocelulósicos que pueden encontrarse en gran abundancia en la naturaleza con producciones anuales de hasta 100 billones de toneladas [18]. Asimismo, los residuos sólidos urbanos, pueden aportar significativamente a este recurso, debido a que la fracción orgánica y la fracción de residuos de la industria del papel, donde pueden encontrarse residuos lignocelulósicos, representan en suma más del 66 %, teniendo en cuenta que en el país se producen anualmente más de $350 \text{ kg habitante}^{-1}$ [19], es una cifra considerable. Por lo tanto, los recursos renovables deben proceder de fuentes sustentables y permitan dar mayor seguridad al futuro energético y al mismo tiempo, disminuir las afectaciones al ambiente.

En este sentido, el trabajo que se presenta pretende contribuir a la diversificación de fuentes energéticas a través de la producción de hidrógeno, un combustible inocuo para el ambiente que cumple los requerimientos energéticos para ser considerado como una alternativa frente al uso de combustibles fósiles. Asimismo, se plantea el uso de carboximetil celulosa (CMC) como sustrato modelo, que es uno de los principales componentes de los materiales lignocelulósicos.

El proceso fermentativo para producción de hidrógeno es en la actualidad la opción más amigable con el medio ambiente, debido a que puede emplear una gran variedad de residuos orgánicos como aquellos generados de los cultivos agrícolas ricos en celulosa, además de utilizar mínimos requerimientos energéticos.

1.3 HIPÓTESIS

Comunidades microbianas con una mayor diversidad aportarán una estabilidad y productividad mayor en reactores productores de hidrógeno vía fermentación. Dicha diversidad microbiana podrá promoverse mediante alteraciones periódicas de pH durante la operación de los reactores.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo general

Promover la diversidad microbiana a través de variaciones periódicas del pH durante la operación de reactores anaerobios semicontinuos y evaluar su efecto en términos de estabilidad y productividad.

1.4.1.2 Objetivos específicos

1. Montar y operar reactores anaerobios inoculados con comunidades microbianas procedentes de excreta de bovino.
2. Evaluar el crecimiento del cultivo en presencia de carboximetil celulosa (CMC) como principal fuente de carbono.
3. Evaluar la producción de hidrógeno a partir de CMC en reactores en lote.
4. Establecer dos regímenes de pH para reactores anaerobios semicontinuos.
5. Evaluar el efecto de diferentes regímenes de pH sobre la productividad de hidrógeno.
6. Evaluar la operación de reactores a través del seguimiento a parámetros bioquímicos.
7. Operar los reactores en ambos tratamientos por al menos 3 meses para evidenciar posibles indicadores de colapso.

1.4 REFERENCIAS DEL CAPÍTULO

- [1] EIA, 2010. International Energy Outlook 2010. Energy Information Administration National Energy Information Center, Washington. BP, 2012. Statistical Review of World Energy. BP, London.
- [2] Ellabban, G. O., Abu-Rub, H., Blaabjerg F. (2014). Renewable energy resources: Current status, future prospects and their enabling technology. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 39, pp. 748–764.
- [3] Secretaría de Energía (SENER). Reporte mensual de estadísticas del sector energético. Recuperado el 30 de agosto de 2014 de <http://egob2.energia.gob.mx/portal/electricidad.html>
- [4] Chapman I. (2014). The end of Peak Oil? Why this topic is still relevant despite recent denials. *Energy Policy* , (64) pp. 93–101.
- [5] Gandía, L. M., Arzamendi, G., Diéguez, P. M. (2013). Renewable Hydrogen Energy: An Overview, pp. 1–17.
- [6] Ritter, S. K. (2011). Global Warming and Climate Change, *Chem. Eng. News*, 21: (11), pp. 132 – 140.
- [7] Pudukudy, M., Yaakob, Z., Mohammad, M., Narayanan, B. Sopian, K. (2014) Renewable hydrogen economy in Asia – Opportunities and challenges: An overview, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, (30), pp. 743–757.
- [8] Cipriani, G. Di, V., Genduso, F. & La, D. (2014). Perspective on hydrogen energy carrier and its automotive applications, *Int. J. Hydrogen Energ.* (39): 16, pp. 8482–8494.

- [9] Wang, X., Monis, P., Saint, C., Jin, B. (2009). Biochemical kinetics of fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* W5, *Int. J. Hydrogen Energy*, 34: (2), pp. 791–798.
- [10] Kothari, R., Singh, D. P., Tyagi, V. V., Tyagi, S. K. (2012). Fermentative hydrogen production – An alternative clean energy source, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 16 (4), pp. 2337–2346.
- [11] Kumar, G., Bakonyi, P., Kobayashi, T., Xu, K.-Q., Sivagurunathan, P., Kim, S.-H., Buitrón, G., Nemestóthy, N., and Bélafi-Bakó, K. (2016). Enhancement of biofuel production via microbial augmentation: The case of dark fermentative hydrogen. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 57, pp. 879–891.
- [12] Valdez, I., y Poggi, H. M.(2009). Hydrogen production by fermentative consortia, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 13: (5), pp. 1000–1013.
- [13] Fang, H.H.P. y Liu, H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresour. Technol.*, 82 (1), pp. 87–93.
- [14] Nissilä, M. E. , Tähti, H. P., Rintala, J., Puhakka, J. (2011). Thermophilic hydrogen production from cellulose with rumen fluid enrichment cultures: Effects of different heat treatments, *Int. J. Hydrogen Energy*, 36: (2), pp. 1482–1490.
- [15] Gadow, S. I. Jiang, H. Watanabe, R. Li, Y.-Y. (2013). Effect of temperature and temperature shock on the stability of continuous cellulosic-hydrogen fermentation, *Bioresour. Technol.*, 142, pp. 304–11.
- [16] Jo, J.H., Jeon, C.O., Lee, D.S., and Park, J.M. (2007). Process stability and microbial community structure in anaerobic hydrogen-producing microflora from food waste containing kimchi. *J. Biotechnol.* 131, pp. 300–308.

- [17] Koskinen, P. (2007). The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidised bed bioreactor. *Biotechnol.* 97, pp. 742–758.
- [18] Secretaría de Desarrollo Social (SEDESOL) 2012. Dirección General de Equipamiento e Infraestructura en Zonas Urbano-Marginadas. México, D.F.
- [19] Percival, Y.-H., Zhang, M. E. Himmel, J. R. Mielenz. (2006). Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.*, 24: (5), pp. 452–81.

CAPÍTULO DOS

2.1 Marco teórico

2.2 Antecedentes

2.1 MARCO TEÓRICO

2.1.1 Energía: situación actual y expectativas futuras.

La energía es un factor central en el desarrollo y funcionamiento de cualquier sociedad. Prácticamente todas las actividades industriales y económicas están relacionadas con la producción o transformación de la energía. En este sentido, es esencial conocer su estado actual y las tendencias a futuro, para asegurar su disposición y permanencia en los próximos años.

En general, la energía puede definirse, de acuerdo a su procedencia, como renovable y no renovable; cuando esta proviene de una fuente natural inagotable y cuando procede de una fuente natural finita, respectivamente. Las fuentes de energía no renovables, como el petróleo y el gas natural, satisfacen la mayor parte de la demanda actual de energía en el mundo. Actualmente, a nivel mundial, alrededor del 80 % de la energía eléctrica se produce a través de combustibles fósiles como el diesel, el carbón y el combustóleo (Véase figura 1) [1-2].

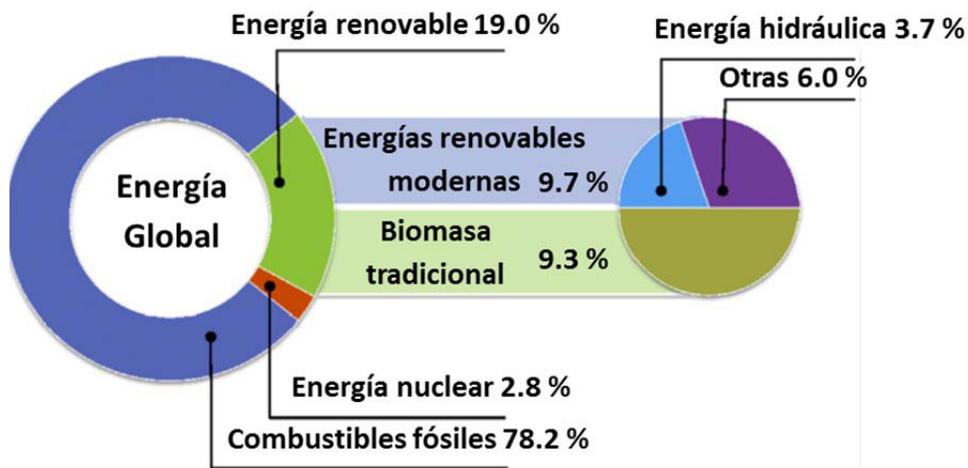


Figura 1. Participación de las energías renovables a nivel mundial. Adaptado de [5]

Sin embargo, existen algunas desventajas asociadas con el uso de fuentes de energía no renovables, por ejemplo, la inestabilidad en su valor monetario, su limitada disponibilidad y su importante contribución al incremento en la concentración de gases de efecto invernadero (GEI) en la atmósfera [2]. Reportes recientes indican que si continúa el ritmo de emisiones de GEI que actualmente prevalece, se estima que en menos de 40 años se podría alcanzar el punto crítico de concentración de CO₂ en la atmósfera, a partir del cual, se presentarían cambios climáticos desfavorables con afectaciones directas en los ciclos naturales del planeta [3].

Por otro lado, las fuentes de energía renovable proceden de recursos naturales que se regeneran en períodos de tiempo que permiten su aprovechamiento sostenible. La energía solar, además de aprovecharse directamente a través de la energía calorífica, fotoquímica y fotoeléctrica, también da lugar indirectamente a energías como la eólica, la hidráulica y a la energía en forma de biomasa producto de la fotosíntesis [2]. Otras fuentes de energía renovable se generan a partir de movimientos naturales o mecanismos del ambiente, como la energía mareomotriz y la geotérmica, respectivamente [4]. Estas fuentes de energía pueden transformarse a formas de energía directamente utilizables, como la energía eléctrica, la calorífica y los combustibles.

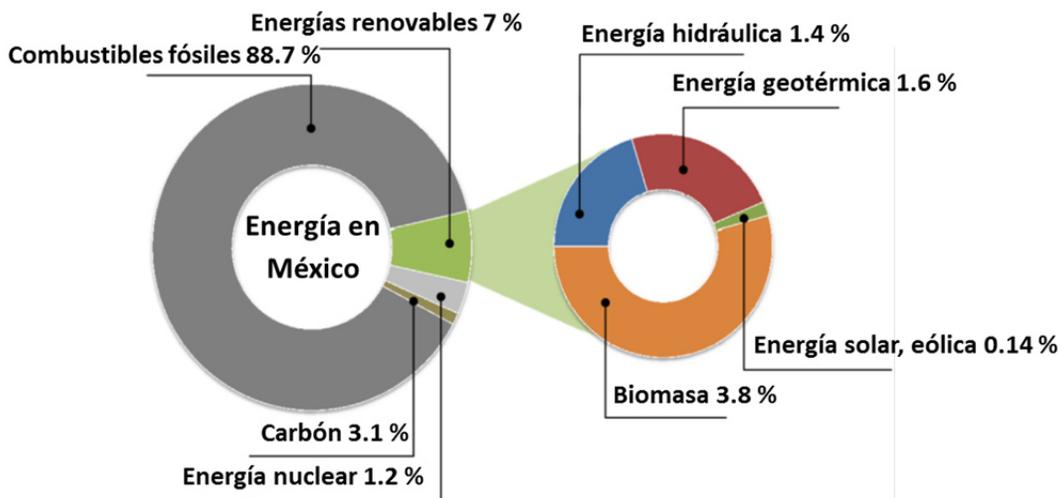


Figura 2. Participación de las energías renovables en México. Adaptado de [5].

No obstante, las energías renovables tienen limitada participación en la generación de energía (Véase Figura 2), pese a que tienen el potencial de cubrir la demanda energética actual más de 3 mil veces [5] [2]. Una de las principales limitantes del uso extensivo de estas tecnologías se relaciona con su dudosa relación costo-eficiencia, debido a su naturaleza intermitente, en comparación con las fuentes fósiles [4].

Por lo tanto, de acuerdo a la demanda futura de energía que se espera incrementarse en un 56% del 2010 al 2040 [4], es necesario continuar el desarrollo científico y tecnológico de las fuentes de energía renovable, de manera que se logren implementar nuevas propuestas alternativas, que permitan una diversificación de las fuentes empleadas actualmente. De esta manera, se podría sustituir gradualmente el uso extensivo de los combustibles fósiles en procesos de generación de energía, y consecuentemente, lograr una reducción significativa en las emisiones de GEI a la atmósfera [6].

2.1.2 Política energética en México

El marco legal actual en relación al estado de la energía en México se sustenta en diferentes leyes, que buscan generar acciones para cubrir la demanda energética futura sin comprometer el equilibrio ambiental. En general, la política energética se soporta en 5 pilares fundamentales: seguridad energética, calidad en el suministro de energía, diversificación de tecnologías y fuentes primarias de energía, eficiencia energética, y desarrollo sustentable en los sistemas de energía.

Como una estrategia para promover el uso racional de la energía en México, el gobierno de la República creó el Programa Nacional para el Aprovechamiento Sustentable de la Energía en donde se establecen estrategias, objetivos, acciones y metas con el fin de alcanzar el uso óptimo de la energía en todos los procesos y actividades para su explotación, producción, transformación, distribución y consumo final.

Además, desde hace algunas décadas los avances en las tecnologías referentes a la generación de energía se han desarrollado hasta incluir nuevas fuentes de generación, lo que ha llevado a una diversificación de las fuentes primarias de energía actuales. Un

ejemplo de ello son los sistemas de producción de energía basados en procesos biológicos, los cuales se han incentivado con la creación de leyes como la de Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos, publicada en el 2008. En donde destacan los objetivos relacionados a la promoción de la generación de insumos para los bionergéticos a partir de diferentes actividades primarias (agropecuarias, forestales, algas, procesos biotecnológicos y enzimáticos del campo mexicano) la comercialización de este tipo de energéticos, mejorar la calidad de vida de los productores, y procurar reducir las emisiones de gases de efecto invernadero.

Asimismo, el Gobierno mexicano ha emitido la Ley de Transición energética, publicada en el 2015. En esta ley se busca la inclusión y el desarrollo de tecnologías limpias y la reducción de emisiones contaminantes principalmente en la generación de energía eléctrica. Con ello se busca la inclusión de energías renovables bajo condiciones de viabilidad económica, se consideran energías como la eólica, solar, hidráulica, energía oceánica, geotérmica, así como los bioenergéticos.

2.1.3 Hidrógeno: sus propiedades y relevancia como portador de energía

Como parte del desarrollo científico en áreas relacionadas con la generación de energía, se han buscado combustibles alternativos que puedan en un periodo de tiempo razonable sustituir de forma gradual la participación de los combustibles fósiles para la obtención de energía. Uno de los más prometedores, de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas, es el hidrógeno (H_2). Este combustible tiene un rendimiento energético de 142.45 kJ g^{-1} , además, su mecanismo de aprovechamiento es compatible con procesos electroquímicos y de combustión para la generación de energía eléctrica [7]. Se ubica como el combustible con la mayor densidad energética por kilogramo, por encima de la gasolina [8] (Véase tabla 1).

Tabla 1. Densidades energéticas de los principales combustibles utilizados [8]. * 20 MPa

Combustible	Densidad energética por unidad de masa (kWh kg^{-1})	Densidad energética por unidad de volumen (kWh L^{-1})	Forma de almacenamiento
Hidrógeno	33.3	0.53*	Gas/líquido
Gas natural	13.9	2.58*	Gas/líquido
Gasolina	12.7	8.76	Líquido
Diesel	11.6	9.7	Líquido
Metanol	5.6	4.42	Líquido

En términos energéticos, el hidrógeno se define como portador o vector de energía, es decir, que la almacena o transporta [7]. Otra característica importante es que durante su combustión se genera agua como único producto, por lo que es un combustible que no emite GEI. Además, puede obtenerse a partir de recursos renovables como la biomasa y el aprovechamiento de la energía solar, por lo que representa una tecnología limpia y con características de sostenibilidad.

De acuerdo con las ventajas que se han mencionado respecto al uso del hidrógeno como combustible alternativo en años recientes, diferentes autores señalan el inicio de una

economía del hidrógeno, que en principio, cubriría la demanda energética en la industria del transporte [7, 9-10].

2.1.3.1 Métodos de producción de hidrógeno

El hidrógeno es el elemento más básico, ubicuo y abundante de la naturaleza. Sin embargo, debido a su alta reactividad, se encuentra unido a otros elementos formando compuestos. Por este motivo, no puede encontrarse libre en el ambiente, sino que tiene que ser extraído de fuentes naturales. Asimismo, su disponibilidad y consecuente uso como combustible, se basan invariablemente en los métodos para su producción existentes. Por lo tanto, son de particular interés los mecanismos de producción para evaluar su viabilidad como combustible energético.

Tabla 2. Comparación de sistemas de producción de hidrógeno utilizados actualmente.

Método de producción	Tasas de producción de H ₂ (mmol H ₂)	Subproductos	Requerimientos energéticos	Reacción general y ventajas
Termoquímicos	-	CO, CO ₂	Aplicación de altas temperaturas 1300-1500 °C	$\text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO} + 3\text{H}_2$
Electroquímicos	-	H ₂ O	Aporte externo de potencial eléctrico	$2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}_2$ (cátodo) + O ₂ (ánodo). Utiliza un recurso natural renovable.
Biológicos (fermentación)	180-200	CO ₂ , CH ₄ , CO, H ₂ S, ácidos orgánicos	H ₂ O, carbohidratos, calor, bacterias fermentadoras	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 12\text{H}_2 + 6\text{CO}_2$ No requiere de entradas externas de energía. Produce metabolitos de alto valor. No requiere de oxígeno.

Actualmente, los métodos de producción de hidrógeno se pueden clasificar como: termoquímicos, electroquímicos y biológicos, como se muestra en la tabla 2 [11]. La producción de hidrógeno por métodos termoquímicos, representa el mayor porcentaje del total de hidrógeno que se produce actualmente a nivel mundial. El reformado catalítico del metano (CH₄) y el metanol (CH₃OH) son procesos que requieren de altas temperaturas, lo que representa un elevado costo económico. Por su parte, los métodos electroquímicos se basan en la ruptura de los enlaces de la molécula del agua (H₂O) para liberar el hidrógeno presente mediante un suministro externo de energía. La energía suministrada genera un costo cercano al 80 % del total de la operación [11]. Si bien, se ha evaluado la posibilidad de sustituir el suministro energético requerido para la separación del hidrógeno del agua, con energía solar, aun es necesario mayor desarrollo científico de este método.

Tabla 3. Comparación de sistemas biológicos para la producción de hidrógeno. Adaptado de Kothari *et al* [15]

Sistema biológico	Tasas de producción de H ₂ (mmol H ₂)	Requerimientos energéticos y microorganismos	Subproductos	Reacción general y ventajas
Biofotólisis directa	0.07	Energía lumínica, H ₂ O, CO ₂ , minerales traza. Microalgas	O ₂	2H ₂ O + luz = 2H ₂ + O ₂ . Se produce H ₂ directamente de agua y luz
Biofotólisis indirecta	0.355	Energía lumínica, H ₂ O, CO ₂ , minerales traza. Microalgas	O ₂	12H ₂ O + luz = 12H ₂ + O ₂ , puede fijar N ₂ de la atmósfera
Fermentación lumínica	153.0	Energía lumínica, H ₂ O, glucosa. Bacterias púrpuras, microalgas	CO ₂	CH ₃ COOH + 2H ₂ O + luz = 4H ₂ + 2CO ₂ Una amplio espectro de luz puede usarse para este tipo de bacterias
Fermentación oscura	121.0	H ₂ O, carbohidratos, calor. Bacterias fermentadoras	CO ₂ , CH ₄ , CO, H ₂ S, acetato u otros productos finales	C ₆ H ₁₂ O ₆ + 6H ₂ O = 12H ₂ + 6CO ₂ No requiere de entradas externas de energía. Puede utilizar diferentes fuentes de carbono como sustrato. Produce metabolitos de alto valor. No requiere de oxígeno.

Por otro lado, los métodos biológicos son procesos sustentables capaces de generar hidrógeno a través del uso de microorganismos especializados. Las ventajas del método biológico se basan en el empleo de fuentes renovables como sustratos y la generación de subproductos no contaminantes. Se distinguen cuatro métodos principales de producción de hidrógeno por esta vía, que son: biofotólisis directa, biofotólisis indirecta, Fotofermentación y fermentación oscura (Véase Tabla 3). De estos, los procesos de fermentación oscura son los más promisorios, porque permiten emplear residuos orgánicos como sustrato, además son procesos más eficientes que pueden operar en ausencia de oxígeno y luz solar [12].

2.1.3.2 Producción biológica de hidrógeno

En ambientes naturales donde el oxígeno es limitado o se encuentra ausente, la degradación de la materia orgánica se realiza a través de procesos anaerobios. En general, la degradación anaerobia puede describirse por medio de diferentes etapas definidas como: hidrólisis, fermentación (acidogénesis, acetogénesis), oxidación de ácidos grasos volátiles y alcoholes, y la conversión de acetato e hidrógeno a metano (Véase figura 3) [13-14].

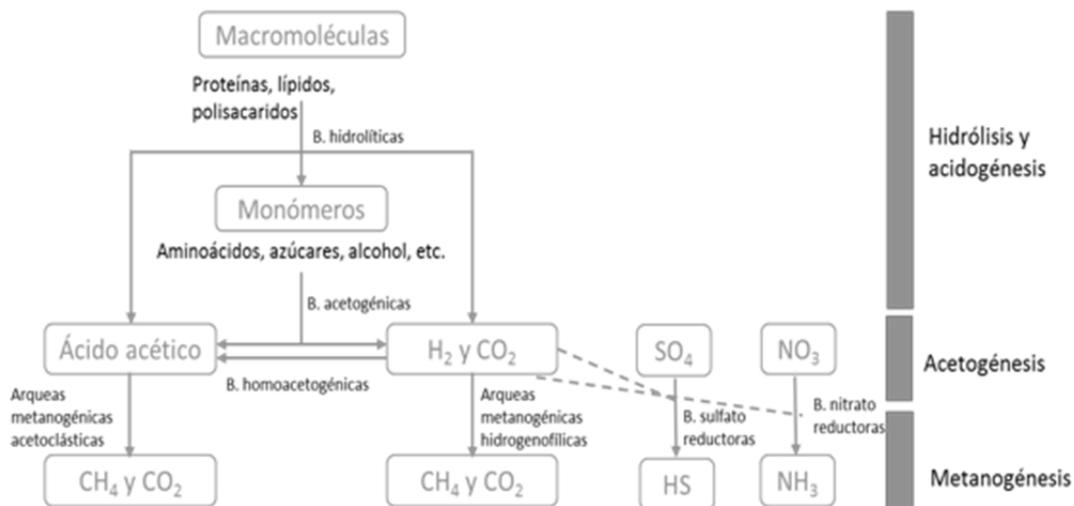


Figura 3. Etapas de degradación de la materia orgánica. Adaptado de [16].

Durante la etapa de hidrólisis, las moléculas de alto peso molecular, como las proteínas y los carbohidratos, son transformadas en moléculas más simples, como monosacáridos y aminoácidos. En la siguiente etapa, los microorganismos acidogénicos o acetogénicos llevan a cabo la producción de ácidos orgánicos y solventes orgánicos, respectivamente, de acuerdo con las condiciones del medio. Finalmente, los microorganismos metanogénicos utilizan los sustratos generados durante la etapa anterior para producir metano (CH₄).

Estudios recientes han demostrado que es posible detener el proceso de transformación de la materia orgánica a metano, para favorecer la producción de hidrógeno que, como se mencionó anteriormente, es un combustible con mayor potencial energético. En este sentido, es posible dirigir la actividad metabólica de microorganismos capaces de producir hidrógeno mediante mecanismos de inhibición de formación de metano.

2.1.3.3 Producción de hidrógeno por fermentación de azúcares con consorcios microbianos

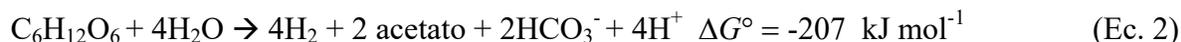
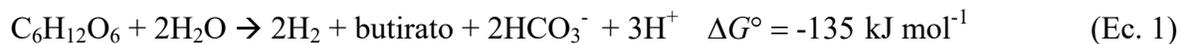
Un consorcio microbiano es un conjunto de poblaciones microbianas de diferentes especies, que interactúan entre sí de manera compleja. Las interacciones entre las poblaciones microbianas dan lugar a una comunidad altamente estructurada, en la que cada grupo tiene un rol fundamental para el sostenimiento de la misma. A partir de esta especialización, los consorcios microbianos pueden generar productos que no podrían obtenerse empleando cultivos de una sola especie [16].

Debido a la diversidad metabólica presente en los consorcios microbianos, se ha extendido su uso hacia la producción de hidrógeno. Las vías metabólicas que permiten la obtención de H₂ son procesos fermentativos realizados por microorganismos anaerobios en ausencia de oxígeno, y se basan en la oxidación incompleta de un sustrato orgánico para producir energía y emplearla en subsecuentes procesos bioquímicos. Los principales

productos obtenidos de la fermentación son: etanol, formato, acetato, propionato, lactato y butirato [17]. Asimismo, durante la generación de estos productos se produce hidrógeno.

Como se mencionó anteriormente, los procesos de fermentación requieren fuentes orgánicas como sustrato. Dentro de las fuentes más utilizadas por los microorganismos se encuentran los carbohidratos o azúcares. Estas moléculas se componen de carbono, oxígeno e hidrógeno, y son una de las fuentes orgánicas más abundantes y con mayor potencial energético. Las formas simples como la glucosa ($C_6H_{12}O_6$), se han utilizado ampliamente como fuentes de carbono y energía en diferentes cultivos microbianos. Estos azúcares representan las unidades monoméricas de moléculas más complejas, como el almidón, el glucógeno y la celulosa.

Los carbohidratos también se han empleado para producción de hidrógeno en procesos fermentativos. La producción de H_2 por molécula de glucosa puede describirse a través de dos reacciones principales, de acuerdo con las siguientes ecuaciones [16]:



Como se observa en las reacciones, el rendimiento máximo de hidrógeno por mol de glucosa se obtiene cuando el producto final de la fermentación es el acetato. Las vías metabólicas que puede seguir el proceso fermentativo dependerán en gran medida de las condiciones ambientales del cultivo, así como de las especies de microorganismos presentes.

De acuerdo con la efectividad mostrada por los carbohidratos como nutrientes para los cultivos microbianos, se han realizado estudios empleando glucosa como sustrato para evaluar la producción de H_2 a diferentes condiciones de pH, concentración de sustrato [18], y tiempo de retención hidráulico (TRH) [19]. Los rendimientos en la producción de H_2

empleando glucosa son un importante indicador de la eficiencia productiva de un consorcio microbiano.

Sin embargo, cabe destacar que los sustratos simples, como la glucosa, son difícilmente aplicados a mayores escalas de producción y su uso se limita a estudios a nivel de laboratorio. Por lo tanto, es importante considerar el uso de sustratos orgánicos que se encuentren ampliamente presentes en la naturaleza y que tengan el potencial de ser utilizados como sustrato para la producción de H₂ a escalas mayores.

2.1.4 Materiales celulósicos como materia prima

2.1.4.1 Características y abundancia

La biomasa es un recurso natural empleado para satisfacer necesidades energéticas, este recurso incluye todo el material orgánico procedente de organismos vegetales. El sentido energético de la biomasa se basa en su capacidad de ser transformada a formas de energía calorífica, eléctrica, y en combustibles [20].

Uno de los principales componentes de la biomasa vegetal son los materiales lignocelulósicos. Estos materiales están formados de celulosa, hemicelulosa y lignina [21]. Su composición típica en las plantas es de un 10 a 15 % de lignina, 20 a 30 % de hemicelulosa y un 40 a 50 % de celulosa [22]. La estructura química general de estos compuestos se basa en repetidas unidades homólogas o heterólogas de monómeros que tienen como objetivo dar soporte y protección a las plantas.

Por su parte, la celulosa se compone de unidades de celobiosa, que a su vez se compone de dos moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4). Estos enlaces permiten la formación de una molécula fibrosa cristalina con regiones amorfas, que dan lugar a una estructura química compleja [23] (Figura. 4).

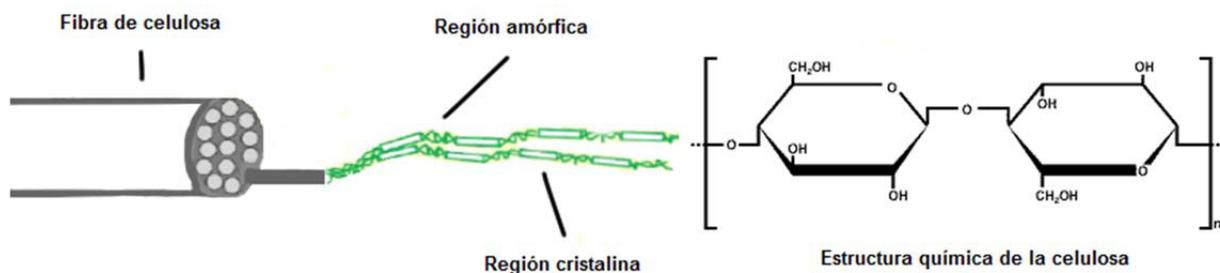


Figura 4. Diferentes arreglos estructurales de la celulosa. Adaptado de Percival *et al.*, [24].

La celulosa es el principal componente encontrado en organismos vegetales, su proporción es variable de acuerdo a cada especie de planta, sin embargo, se encuentra en mayor cantidad que cualquier otro componente orgánico. En este sentido, la celulosa es un recurso ampliamente distribuido en la naturaleza, con una producción sintética anual estimada en 100 billones de toneladas en peso seco [24], por lo tanto, se considera como el recurso renovable más abundante en la biosfera [25]. Además, puede encontrarse en efluentes industriales, y residuos agrícolas [21]; lo cual da a este recurso un sentido de sostenibilidad y disponibilidad.

En México, pueden encontrarse materiales lignocelulósicos en los residuos sólidos urbanos (RSU), en donde es posible encontrar un 13.8 % de residuos de papel, cartón y productos de papel. Asimismo, en la fracción orgánica que corresponde al 50 % del total de RSU es posible encontrar residuos de jardín [26]. Por lo anterior, el potencial de aprovechamiento de estos residuos, vistos en algunas ocasiones como materias primas, es enorme y el reto para su aprovechamiento también lo es.

2.1.4.2 Degradación natural de la celulosa

En condiciones naturales, la celulosa puede utilizarse como recurso de carbono y energía por diferentes especies microbianas. Se ha observado que la degradación de celulosa involucra la actividad microbiana de metabolismos sintróficos, en donde los productos que genera la actividad metabólica de un grupo de microorganismos en particular, dentro de una comunidad o consorcio, permite la actividad de otros grupos vecinos.

La degradación de celulosa puede tener lugar en ambientes acuáticos y terrestres. Incluso se presenta en tractos digestivos de rumiantes o termitas, en donde se transforma en productos de valor energético, como glucosa y ácidos orgánicos [21] [25] [27].

Diferentes especies de microorganismos son capaces de actuar sobre la celulosa. Por ejemplo, especies del género *Clostridium* cuentan con la capacidad enzimática para

hidrolizar y llevar a cabo la fermentación de la celulosa en diferentes ambientes carentes de oxígeno.

La utilización de celulosa inicia con una etapa de hidrolisis, por actividad de enzimas endogluconasas, para dar lugar a oligosacáridos de longitud variable (2 a 10 monosacáridos) que en una segunda etapa, se utilizan de forma progresiva por enzimas exogluconasas para dar lugar a monosacáridos y disacáridos como la glucosa y la celobiosa, respectivamente. Finalmente, las enzimas β -glucosidasas actúan sobre los enlaces glucosídicos del disacárido celobiosa para liberar las unidades de glucosa [21] [23].

2.1.4.3 Métodos de conversión de celulosa en hidrógeno

Como se mencionó anteriormente, la celulosa presenta una estructura compleja que da soporte a las plantas y las protege de la degradación natural [28]. En este sentido, la celulosa requiere ser hidrolizada para obtener compuestos que posteriormente puedan ser fermentados para producir hidrógeno.

Las largas cadenas de glucosa se agrupan en estructuras superiores que dan lugar a una estructura cristalina (Figura 4). Esta estructura cristalina limita en cierta medida la hidrólisis de la celulosa, por ello, se han desarrollado tratamientos ácidos, alcalinos, termoquímicos y biológicos que puedan realizar esta tarea [29]. De estos, los métodos biológicos son los más efectivos, económicos, ambientalmente seguros y representan el menor peligro para la salud [28].

Asimismo, los tratamientos biológicos permiten unir la hidrolisis al proceso de fermentación a través de microorganismos que pueden llevar a cabo una o ambas funciones. La fermentación tiene lugar cuando las condiciones ambientales permiten el desarrollo de bacterias anaerobias que metabolizan las azúcares a través de la ruta bioquímica Embden-Meyerhof. Esta ruta permite la producción de hidrógeno por cada mol de hexosa (azúcar de 6 carbonos), en una proporción que se define de acuerdo con el compuesto orgánico que actúe como aceptor final de electrones. Por ejemplo, cuando el aceptor final de electrones

es el acetato, se pueden obtener, teóricamente, hasta 4 moles de H₂ por mol de hexosa. Dentro de los materiales celulósicos empelados para la producción de hidrógeno se encuentran los filtros de celulosa, lignocelulosa, las microalgas, granos procedentes de destilados, cáscaras de cebada, pastos forrajeros y bagazo, entre otros. De los cuales se han obtenido rendimientos de hasta 1.56 mol H₂ por mol de hexosa [30] [31] [32].

2.2 ANTECEDENTES

2.2.1 Microorganismos involucrados en la producción de H₂ vía fermentación de celulosa

Las especies microbianas asociadas con la degradación de celulosa se encuentran con frecuencia en interacción con otras especies, en una comunidad o consorcio microbiano. De forma natural, estas especies llevan a cabo una relación sintrófica, en donde los productos generados del metabolismo de una especie microbiana en particular, pueden ser utilizados por una segunda especie, que se beneficia al tener acceso a estos productos [16].

Las fuentes de aislamiento de especies microbianas capaces de degradar celulosa están relacionadas con la presencia de material vegetal en los suelos, sistemas acuáticos, efluentes industriales, y en sistemas digestivos de animales herbívoros y consumidores de madera [33-38]. En este sentido, se han realizado diferentes estudios para evaluar la actividad degradadora-fermentativa de celulosa en inóculos obtenidos de estas fuentes.

Nissilä *et al.*, [39] emplearon un inóculo microbiano aislado de un fluido de rumen de bovino para evaluar la producción de H₂ empleando celulosa (Sigma cellulose type 20 µm) como fuente de carbono. Además, se evaluó la dinámica poblacional de las comunidades microbianas sometidas a temperaturas de 52, 60 y 65 °C. Encontraron especies pertenecientes al género *Clostridium* como las más abundantes. La mayor producción de H₂ se presentó a los 60 °C (1.93 mol H₂ mol de hexosa⁻¹). Especies como *C. thermocellum*, *C. anaerobacterium*, *C. acetobutylicum*, entre otras de este género, han sido ampliamente utilizadas de acuerdo a su observada capacidad de hidrolizar compuestos celulósicos y a la importante diversidad que presentan.

En estudios recientes se han reportado nuevas especies implicadas en la hidrólisis de celulosa y la producción efectiva de H₂, por lo que su potencial de aprovechamiento

permanece todavía en proceso de desarrollo y se requieren más estudios que evalúen sus capacidades en diferentes condiciones de cultivo [40].

2.2.2 Factores clave en la producción de H₂ vía fermentación

Algunas de las principales variables a considerar cuando se trabajan con reactores biológicos son el tiempo de retención hidráulico (TRH), pH, y temperatura. Estos parámetros determinan de forma importante la obtención de rendimientos en la producción de H₂. Por ejemplo, se ha observado que a temperaturas mayores de 37 °C, la producción de hidrógeno se ve favorecida con mejores rendimientos y una mayor estabilidad del sistema [41].

Por otra parte, diferentes estudios han señalado que TRH cortos entre 1.5 a 6 h, permiten un mejor equilibrio en el sistema teniendo como resultado la obtención de rendimientos de H₂ [42-45]. Sivagurunathan *et al.*, [46] reportan un productividad máxima de H₂ (PMH) y rendimiento de H₂ de 56.8 L L⁻¹d⁻¹ y 2.25 mol mol galactosa⁻¹, respectivamente, a un TRH de 2 h. Sin embargo, se debe considerar los probables lavados de biomasa en los reactores cuando se utilizan TRH demasiado cortos [16]. Esto se logra debido a una inhibición de microorganismos metanogénicos que son consumidores de H₂.

Por su parte, el valor del pH en el medio es otra variable trascendente, debido a que aun cuando los valores de este factor varíen en unidades de 0.5 existen efectos significativos sobre la producción de H₂, ya sea por inhibición de microorganismos consumidores de H₂ o para favorecer el crecimiento de los productores de este [47].

La adición de co-sustratos es otro factor que se ha probado con efectos positivos en la producción de H₂. Islam *et al.*, [48] encontraron que los principales sustratos que favorecen de forma significativa la producción de H₂ a partir de celulosa, en condiciones fermentativas, fueron el extracto de levadura, α-celulosa, CaCl₂ y MgCl₂.

2.2.3 Evaluación de la producción de H₂ con celulosa

Se ha mencionado que la celulosa es un sustrato ampliamente distribuido en la naturaleza y que al ser un carbohidrato, compuesto por unidades de glucosa, puede ser potencialmente aprovechado como un recurso energético. Asimismo, se ha observado que a partir de compuestos celulósicos es posible generar hidrógeno por vías fermentativas.

Sin embargo, la celulosa presenta desafíos importantes que es pertinente resolver, previo al desarrollo de tecnologías que promuevan su aplicación a una escala industrial. Al respecto, se han realizado diferentes estudios dirigidos a mejorar la eficiencia en la biotransformación de celulosa en H₂, considerando las diferentes condiciones ambientales que pueden limitar los procesos fermentativos en cultivos microbianos.

Geng *et al.*, [49] utilizaron como recurso de celulosa papel filtro Whatman® No. 1, para esto evaluaron el efecto de la cantidad de inóculo por especie, concentración de extracto de levadura y la alcalinidad sobre el rendimiento en la producción de H₂ de un cultivo mixto compuesto por *Clostridium thermocellum* y *Clostridium thermopalmarium*. En sus resultados obtuvieron que *C. thermocellum* fue capaz de crecer sobre celulosa a diferencia de *C. thermopalmarium* que fue dependiente de los productos generados a partir de la actividad hidrolítica de *C. thermocellum*.

Por su parte, el incremento en las adiciones de extracto de levadura en el medio tuvo un efecto positivo tanto en la degradación de celulosa así como en la producción de H₂, con valores de 396 mL L⁻¹ y 3.81 g L⁻¹, respectivamente, a una concentración de papel filtro de 4.5 g L⁻¹. Ambas especies se beneficiaron con la adición de este co-sustrato al obtener nutrientes en forma de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento aún desconocidos.

Por otro lado, la alcalinidad también mostró un efecto positivo en la producción de H₂. El papel filtro se adicionó a una concentración de 9 g L⁻¹. El tratamiento alcalino se realizó mediante adiciones de carbonato de potasio (KHCO₃) en el medio. Este tratamiento,

incrementó la utilización de celulosa de 1.23 g L^{-1} a 8.59 g L^{-1} , así mismo se registró una máxima producción de H_2 de 1837 mL L^{-1} .

Ren *et al.*, [50] utilizaron celulosa cristalina como recurso de carbono a diferentes concentraciones. En su estudio, emplearon un inóculo procedente de estiércol de vaca para evaluar su actividad en la degradación de celulosa y producción de hidrógeno. Los ensayos se realizaron en reactores en lote de 250 mL, con un volumen de trabajo de 120 mL. Las condiciones de cada reactor se mantuvieron constantes, con excepción de la concentración de celulosa, que fue la variable a medir en los experimentos.

La degradación de celulosa inició a las 18 h de operación y conforme se incrementó su concentración en el medio, se observó una mayor degradación, hasta las 120 h. La concentración de celulosa a la cual se obtuvo la mayor degradación fue de 10 g L^{-1} , que coincide con el máximo crecimiento celular medido de 1.5 DO_{600} . Una tendencia similar se observó para la producción acumulativa de H_2 . Los resultados muestran un 55 % de degradación de celulosa, con una máxima producción acumulativa de H_2 , velocidad de producción y rendimiento de 1525 mL L^{-1} , $33 \text{ mL L}^{-1}\text{h}^{-1}$ y $272 \text{ mL g de celulosa}^{-1}$, respectivamente.

En un estudio reciente Gadow *et al.*, [51], determinaron el efecto de la temperatura sobre el rendimiento en la producción de H_2 y la fermentación de celulosa utilizando un cultivo mixto procedente de un digestor anaerobio de lodos. Los ensayos se realizaron en un reactor de flujo continuo, con un volumen de trabajo de 6 L, a un TRH de 10 días, y un pH ajustado al inicio de 5.5-6.0. El reactor operó durante 250 días, durante los cuales, mostró un desempeño estable, alcanzando la fase estacionaria del cultivo a los 90 días.

El rendimiento máximo alcanzado por el reactor después de 150 días de operación fue de $7.07 \text{ mmol H}_2 \text{ g de celulosa}^{-1}$. La generación de subproductos se mantuvo estable, sin llegar a acumularse. En los estudios de la dinámica poblacional encontraron que la mayoría de las especies identificadas mantuvo relación con el género *Clostridium*. La especie bacteriana dominante fue *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, con un

crecimiento óptimo a temperaturas en el intervalo de 60-70 °C. Además, se realizó un estudio paralelo donde se determinó el efecto de las variaciones en la temperatura dentro del intervalo 25-85 °C, sobre la producción de hidrógeno. En este estudio se determinó una producción máxima de hidrógeno de 734.4 mL L⁻¹ a los 65 °C, y se observó que la variación en las temperaturas tuvo un efecto sobre la composición y proporción de los subproductos de fermentación como los ácidos grasos volátiles, el etanol y el ácido láctico.

Se ha evaluado también el efecto de pretratamientos que involucran una hidrólisis de los materiales celulósicos previo a la aplicación de procesos fermentativos. Si bien, se han obtenidos incrementos en el rendimiento general del proceso. Estos procesos requieren de un tratamiento previo que significaría incrementos en el costo operativo del proceso.

Además, existen todavía estrategias que pueden seguirse para mejorar los rendimientos actuales en la producción de H₂ como son la ingeniería de cultivos, la ingeniería genética, o algunas técnicas en bioprocesos que permitan mejorar los rendimientos sin elevar los costos de operación evitando tratamientos previos. Una aplicación a escala mayor de este proceso no permitiría factiblemente aplicar pretratamientos a efluentes industriales.

REFERENCIAS DEL CAPÍTULO

- [1] Secretaría de Energía (SENER). Reporte mensual de estadísticas del sector energético. Recuperado el 30 de agosto de 2014 de <http://egob2.energia.gob.mx/portal/electricidad.html>
- [2] Ellabban, G. O., Abu-Rub, H., Blaabjerg F. (2014). Renewable energy resources: Current status, future prospects and their enabling technology. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 39, pp. 748–764.
- [3] Gandía, L. M., Arzamendi, G., Diéguez, P. M. (2013). *Renewable Hydrogen Energy: An Overview*, pp. 1–17.
- [4] Iqbal, M., Azam, M., Naeem, M., Khwaja, A. S. Anpalagan, A. (2014). Optimization classification , algorithms and tools for renewable energy : A review, *Adv. Bioscienc. Biotechnol.*, 39, pp. 640–654.
- [5] Alemán, G. S. , Casiano, V. H., Cárdenas, D. L., Díaz, R., Scarlat, N., Mahlknecht, J., Dallemand, J.-F., Parra, R. (2014). Renewable energy research progress in Mexico: A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 32, pp. 140–153.
- [6] European Renewable Energy Council (EREC). RE-thinking 2050. Recuperado el 20 septiembre de 2014 de <http://www.erec.org/renewable-energy.html>
- [7] Pudukudy, M., Yaakob, Z., Mohammad, M., Narayanan, B., Sopian, K. (2014). Renewable hydrogen economy in Asia – Opportunities and challenges: An overview, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 30, pp. 743–757.
- [8] Cipriani, G. Di, V., Genduso, F. & La, D. (2014). Perspective on hydrogen energy carrier and its automotive applications, *Int. J. Hydrogen Energ.*, (39): 16, pp. 8482–8494.

- [9] Andrews, J. & Shabani, B. (2012). Where does Hydrogen Fit in a Sustainable Energy Economy?, *Procedia Eng.*, 49, pp. 15–25.
- [10] Boudries, R. (2014). Hydrogen as a fuel in the transport sector in Algeria, *Int. J. Hydrogen Energ.*, 9, pp. 1–9.
- [11] Chaubey, R., Sahu, S., James, O. O., Maity, S. (2013). A review on development of industrial processes and emerging techniques for production of hydrogen from renewable and sustainable sources, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 23, pp. 443–462.
- [12] Wang, X., Monis, P., Saint, C., Jin, B. (2009). Biochemical kinetics of fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* W5, *Int. J. Hydrogen Energy*, 34: (2), pp. 791–798.
- [13] Vavilin, V. A., (1996). A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter, 56, pp. 229–237.
- [14] Buitrón, G., Carvajal, C. (2009). Producción de hidrógeno a partir de aguas residuales, *Revista Digital Universitaria*, pp 130-138.
- [15] Kothari, R., Singh, D. P., Tyagi, V. V., Tyagi, S. K. (2012). Fermentative hydrogen production – An alternative clean energy source, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 16: (4), pp. 2337–2346.
- [16] Valdez, I., y Poggi, H. M.(2009). Hydrogen production by fermentative consortia, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 13: (5), pp. 1000–1013.
- [17] Infantes, D., González del Campo, A., Villaseñor, J., y Fernández, F. J. (2011). Influence of pH, temperature and volatile fatty acids on hydrogen production by acidogenic fermentation, *Int. J. Hydrogen Energy*, 36: (24), pp. 15595–15601.
- [18] Li, Z., Wang, H., Tang, Z., Wang, X., y. Bai, J. (2008). Effects of pH value and substrate concentration on hydrogen production from the anaerobic fermentation of glucose, *Int. J. Hydrogen Energy*, 33: (24), pp. 7413–7418.

- [19] Kumar, G. , Park, J., Kim, M., Kim, D., & Kim, S. (2014). Hydrogen fermentation of different galactose e glucose compositions during various hydraulic retention times (HRTs), *Int. J. Hydrogen Energy*, 39: (35), pp. 1–7.
- [20] Paz, A.M. (2013). Biological Resources for Energy, *Bolletín Recursos*, pp. 2012–2014.
- [21] Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., Isak, S., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology *Microbiol Mol Biol Rev.*, 66: (3), pp. 506-577.
- [22] Iqbal, H.M.N. (2011). Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility. *Advan. Bioscien. Biotechnol.*, 02 (03), pp. 149–156.
- [23] Nissila, M. E. , Lay, C., & Puhakka, J. A. (2014). Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates: A review, *Biomass Bioenerg.*, 67, pp. 145–159.
- [24] Percival, Y.-H., Himmel, M. E., Mielenz, J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies, *Biotechnol. Adv.*, 24: (5), pp. 452–81.
- [25] Ahmad, F., Atiyeh, M. N., Pereira, B., Stephanopoulos, G. N. (2013). A review of cellulosic microbial fuel cells: Performance and challenges, *Biomass Bioener.*, 56, pp. 179–188.
- [26] Secretaría de Desarrollo Social (SEDESOL) 2012. Dirección General de Equipamiento e Infraestructura en Zonas Urbano-Marginadas. México, D.F.
- [27] Ohkuma, M., (2003). Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61: (1), pp. 1–9.

- [28] Zhao, X., Zhang, L., & Liu, D. (2012). Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuel. Bioprod. Bior.*, 6(4), pp. 465–482.
- [29] Anwar, Z., Gulfraz, M., & Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *J Radiat. Res. Appl. Scien.*, 7(2), pp. 163–173.
- [30] Magnusson, L., Islam, R., Sparling, R., Levin, D., Cicek, N. (2008). Direct hydrogen production from cellulosic waste materials with a single-step dark fermentation process, *Int. J. Hydrogen Energy*, 33: (20), pp. 5398–5403.
- [31] Chang, J. J., Lin, J.-J., Ho, C.-Y., Chin, W.-C., Huang, C.-C. (2010). Establishment of rumen-mimic bacterial consortia: A functional union for bio-hydrogen production from cellulosic bioresource, *Int. J. Hydrogen Energy*, 35: (24), pp. 13399–13406.
- [32] Ho, K. L., Lee, D.-J. A. Su, Chang, J.-S. (2012). Biohydrogen from cellulosic feedstock: Dilution-to-stimulation approach, *Int. J. Hydrogen Energy*, 37: (20), pp. 15582–15587.
- [33] Durré, P. (2005) *Handbook on Clostridia*. Taylor & Francis Group. LLC, pp 102-120.
- [34] Pourchera, A.-M., Sutrab, L., Hébéa I., Moguedeta, G., Bolletc, C., Simoneaub, P., Gardan, L. (2001) Enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from refuse of a landfill. *Microbiol. Ecol.*, 34: (3), pp 229–241
- [35] Chantarasiri, A., Bacillus, A., (2015). JD0404 isolated from the muddy sediments of mangrove swamps in Thailand and characterization of its cellulolytic activity. *Egypt. J. Aquat. Resear.*, 41, pp 257–264
- [36] Lednická, D., Mergaert, J., Margo C. Cnockaert, C., Swings, J., (2000). Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria Involved in the Degradation of Natural Cellulosic Fibres. *System. Appl. Microbiol.*, 23: (2), pp. 292-299.

- [37] Ferbiyanto, A., Rusmana, I., Raffiudin, R. (2015). Characterization and Identification of Cellulolytic Bacteria from gut of Worker *Macrotermes gilvus*. HAYATI J. Bioscienc., 22, pp. 197e200
- [38] Mudasir A. Dara, S., Kiran D. Pawarb, Yoti P. Jadhavb, Radhakrishna S. Pandita. (2015). Isolation of cellulolytic bacteria from the gastro-intestinal tract of *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) and their evaluation for cellulose biodegradation. Int. Biodeter. Biodegradat., 98, pp 73–80
- [39] Nissilä, M. E., Tähti, H. P., Rintala, J., Puhakka, J. (2011). Thermophilic hydrogen production from cellulose with rumen fluid enrichment cultures: Effects of different heat treatments, Int. J. Hydrogen Energy, 36: (2), pp. 1482–1490.
- [40] Cao, G. L., Zhao, L., Wang, A.-J., Wang, Z.-Y. Ren, N.-Q. (2014). Single-step bioconversion of lignocellulose to hydrogen using novel moderately thermophilic bacteria., Biotechnol. Biofuels., 7: (1) pp. 82.
- [41] Gadow, S. I. Jiang, H. Watanabe, R., Li, Y.-Y. (2013). Effect of temperature and temperature shock on the stability of continuous cellulosic-hydrogen fermentation., Bioresour. Technol., 142, pp. 304–11.
- [42] Ueno Y, Otsuka S, Morimoto M. (1996). Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture. J Ferment Bioeng, 82 (2): pp. 194–197
- [43] Lin CY, Chang RC. (1999). Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. J Chem Technol Biotechnol 1999; 74:498–500.
- [44] Han SK, Shin HS. Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. Int J Hydrogen Energy, 29: pp. 569–77.
- [45] Moreno. I., Carrillo, J., Santiago, I., Bujanos., M. C. (2015). Biohydrogen from food waste in a discontinuous process: Effect of HRT and microbial community analysis. Int. J. Hydrogen Energy, 40: (48), pp. 17246–17252.

- [46] Sivagurunathana, P., Anburajanb, P., Kumard, G., Kim, S. H. (2016). Effect of hydraulic retention time (HRT) on biohydrogen production from galactose in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.047>. Available online 21 June 2016.
- [47] Moon, C., Jang, S., Yun, Y. M., Lee, M. K., Kim, D. H., Kang, W. S., Kwak, S. S., Kim, M. S. (2015). Effect of the accuracy of pH control on hydrogen fermentation. *Bioresource Technology* 179, pp 595–601.
- [48] R. Islam, N. Cicek, R. Sparling, and D. B. Levin. (2012). Enhanced cellulose fermentation and end-product synthesis by *Clostridium thermocellum* with varied nutrient compositions under carbon-excess conditions, *Biomass Bioenerg.*, 8, pp. 213 - 223.
- [49] Geng, A., He, Y., Qian, C., Yan, X., Zhou, Z. (2010). Effect of key factors on hydrogen production from cellulose in a co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermopalmarium*., *Bioresour. Technol.*, 101: (11), pp. 4029–4033.
- [50] Ren, N. Q., Xu, J.-F., Gao, L.-F., Xin, L., Qiu, J., Su, D.-X. (2010). Fermentative bio-hydrogen production from cellulose by cow dung compost enriched cultures, *Int. J. Hydrogen Energy*, 35:(7), pp. 2742–2746.
- [51] Gadow, S. I., Jiang, V., Hojo, T Li, Y.-Y. (2013). Cellulosic hydrogen production and microbial community characterization in hyper-thermophilic continuous bioreactor,” *Int. J. Hydrogen Energy*, 38: (18), pp. 7259–7267.

CAPÍTULO TRES

MATERIALES Y MÉTODOS

- 3.1 Diagrama general de la etapa experimental
- 3.2 Inóculo y sustrato
- 3.3 Operación de reactores fermentadores
- 3.4 Análisis bioquímicos
- 3.5 Métodos analíticos

3.1 Diagrama general de la etapa experimental

En la figura 5, se presenta el esquema general del proyecto que incluye las principales etapas del mismo y su relación secuencial. Asimismo, se presentan los procedimientos y métodos utilizados para realizar la etapa experimental.

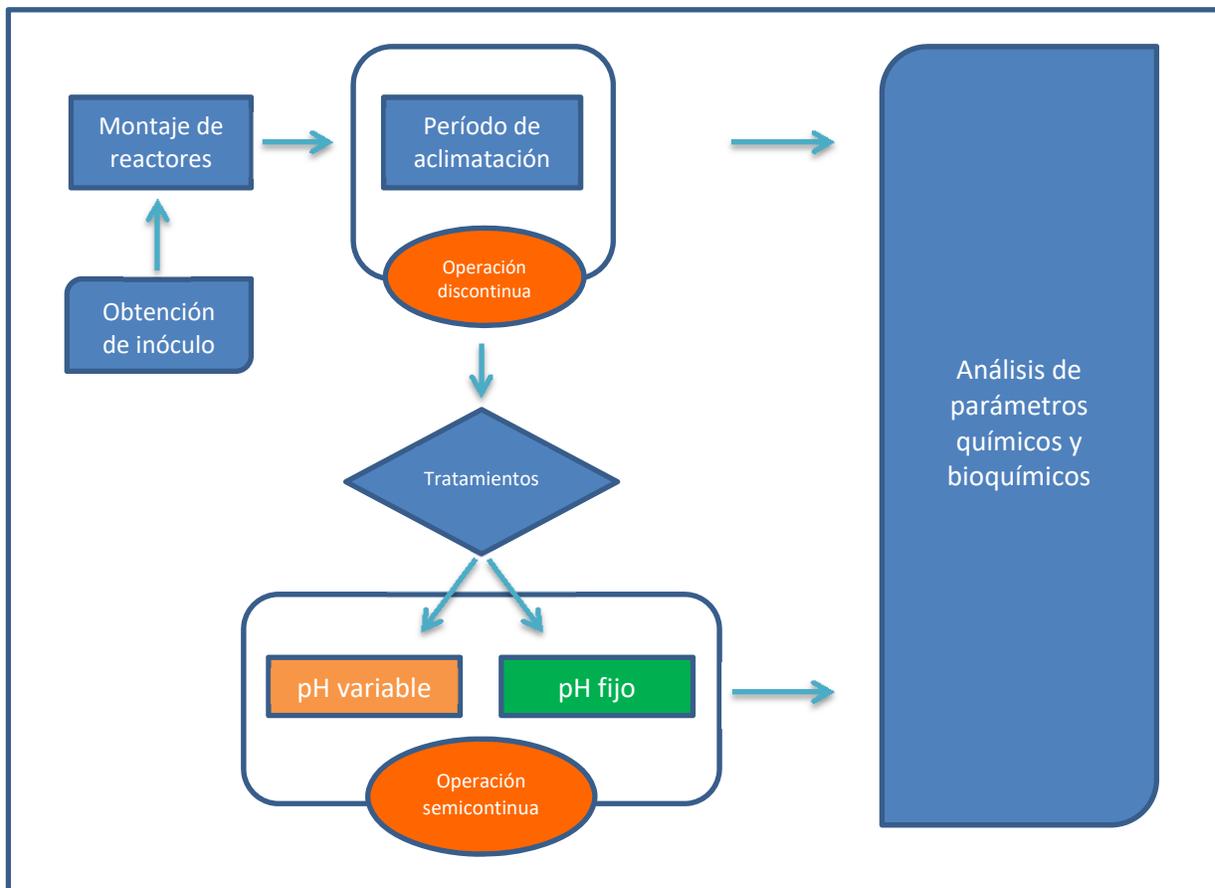


Figura 5. Descripción del diagrama de flujo que representa la metodología general de la parte experimental del proyecto

3.2 Inóculo y sustrato

Se utilizó excreta de bovino como fuente de inóculo para los bioensayos. Las muestras de excreta de bovino se obtuvieron de un establo dentro de las instalaciones de la Facultad de Agronomía, UANL. El ejemplar tenía una dieta basado en forraje de alfalfa principalmente. La muestra de excreta se llevó al laboratorio para su preparación y filtrado. La preparación del inóculo se realizó mediante soluciones de 13 g de excreta y 13 mL de agua destilada. Se agitaron con el propósito de homogenizar y desprender las bacterias adheridas a las partículas sólidas. Se realizaron filtraciones de las soluciones de inóculo utilizando mallas de algodón para retener las partículas no disueltas y que pudieran representar problemas en su posterior manejo.

Como sustrato modelo de los materiales lignocelulósicos se empleó carboximetil celulosa de sodio (CMC) (Sigma Aldrich®), que es una sal de celulosa, con un peso molecular de $982.58 \text{ g mol}^{-1}$ que se calculó de acuerdo a la fórmula química $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{Na}_8\text{O}_{27}$. En la figura 6 se presenta la estructura química de la CMC.

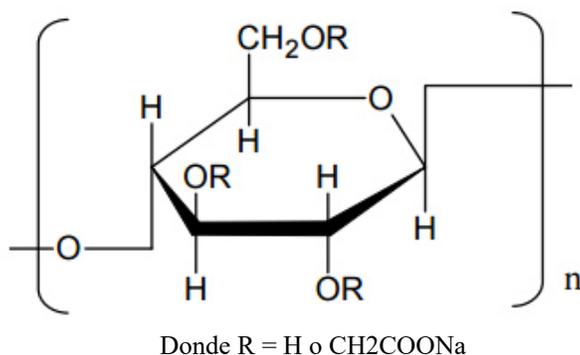


Figura 6. Estructura química de la carboximetil celulosa (CMC).

3.3 Operación de reactores fermentadores

3.3.1 Reactores en lote

Durante esta etapa de operación, se empleó un medio de cultivo enriquecedor (MCE) para promover el crecimiento de microorganismos, con la siguiente composición (g L^{-1}): triptona, 5; peptona, 5; extracto de levadura, 10; K_2HPO_4 , 1; KH_2PO_4 , 4.4; MgCl_2 0.1; NaCl , 2; KCl , 0.1; FeSO_4 , 0.0011; CaCl_2 , 0.5. Asimismo, al medio de cultivo se añadió carboximetil celulosa, como principal fuente de carbono, a una concentración de 10 g L^{-1} . La preparación final del medio incluyó 2.4 g L^{-1} de 2-bromoetanol sulfonato de sodio (BES), como inhibidor del crecimiento de microorganismos productores de metano. El pH final del medio se ajustó a 5.5.

Se montaron ocho reactores que consistieron en botellas serológicas con cierre hermético, de un volumen de 168 mL de capacidad. Se añadieron 104 mL de MCE, y 26 mL de solución de inóculo para obtener un volumen de trabajo de 130 mL. Los reactores se incubaron a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ con agitación moderada para homogenizar el medio. Se tomaron muestras de cada reactor al inicio de la incubación para establecer los parámetros iniciales.

La operación de los reactores en lote se realizó en tres ciclos. Cada ciclo de operación tuvo un tiempo promedio de 17 días, al finalizar este tiempo se realizaron alimentaciones con MCE para reponer los sustratos consumidos, cuando se observaron tendencias de disminución en la producción de biogás.

3.3.2 Reactores semicontinuos

Durante esta etapa, se cambió el modo de operación de lote a semicontinuo. La operación semicontinua de los reactores se realizó utilizando un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 5 días, y se definió el flujo de alimentación de 26 mL cada 24 h, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Flujo de alimentación} = V_r / TRH \quad (\text{Ec. 1})$$

Asimismo, se establecieron dos tratamientos en función del pH. Para el primer tratamiento, llamados reactores con pH fijo, el pH de los reactores se mantuvo a un valor 5.5 ± 0.3 . En el segundo tratamiento, llamados reactores con pH variable, el pH de los reactores tuvo 2 regímenes de 7 días, un régimen con un pH de 5.5 ± 0.3 y otro régimen con un pH de 7.0 ± 0.4 . Estos dos regímenes se repitieron durante todo el tiempo de operación de los reactores. Las variaciones y ajustes de pH se realizaron mediante la adición de NaOH o HCl. En la figura 7, se presenta un esquema descriptivo de la operación semicontinua de acuerdo a cada tratamiento establecido.

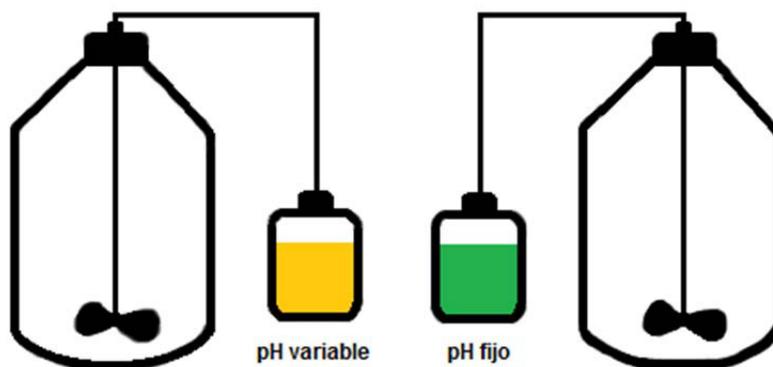


Figura 7. Esquema representativo de los reactores en modo de operación semicontinuo.

Durante esta etapa se utilizó medio de cultivo mineral (MCM) con la siguiente composición (g L^{-1}): carboximetil celulosa de sodio, 10; urea, 0.45; K_2HPO_4 , 1; KH_2PO_4 , 4.4; MgCl_2 0.1; NaCl, 2; KCl, 0.1; CaCl_2 , 0.5. Además, por cada litro de medio, se

añadieron las siguientes cantidades de sales minerales (mg L^{-1}): $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.4; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2; H_3BO_4 , 2; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2; ZnCl_2 , 2.

La operación de los reactores en esta fase de operación incluyó una re-inoculación en el día 241 de operación, la cual se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 3.2, con una diferencia en la fuente de inóculo que en este caso consistió en muestras de rumen de bovino obtenidas de un ejemplar con fístula.

3.4 Análisis bioquímicos

3.4.1 Determinación de pH

Las determinaciones de pH se realizaron con un medidor de pH Accumet® Basic modelo AB15. Para todos los reactores, las mediciones de pH se realizaron después de cada alimentación, y se reportó el valor promedio de las réplicas.

3.3.2 Crecimiento celular

El crecimiento celular se determinó como sólidos suspendidos volátiles (SSV) de acuerdo al procedimiento 2540 D y E [1] que establece los procedimientos para la determinación de sólidos y sales disueltas en aguas residuales y residuales tratadas.

3.3.3 Consumo de sustrato

3.3.3.1 Fundamento del método

El seguimiento al consumo de CMC se realizó por el método reportado por Dubois *et al.* [2] conocido también como método fenol-sulfúrico. Este método, se fundamenta en que los carbohidratos presentan una sensibilidad particular a los ácidos fuertes y a las altas temperaturas. En estas condiciones, una serie de reacciones complejas tienen lugar empezando por una deshidratación simple, seguida de un calentamiento y finaliza con la catálisis ácida la cual produce diferentes derivados de furano, que se condensan entre sí y con otros subproductos para dar lugar a compuestos con colores característicos. Estas formas de fenol coloridas absorben la luz en el rango visible a una longitud de onda de 490 nm [3].

3.3.3.1 Preparación y análisis de las muestras

Para el análisis se tomó un volumen de 1 mL por muestra, y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min. Posteriormente se añadió un volumen de 1 mL de fenol al 5 %, sobre las muestras y controles. Luego, se añadieron 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Una vez añadido el ácido sulfúrico sobre las muestras con fenol, se realiza una agitación moderada y posteriormente se dejan en reposo durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se realizan las mediciones mediante un espectrofotómetro UV-Vis, a una longitud de onda única de 490 nm.

Se realizaron diferentes curvas de calibración para estimar las concentraciones de carbohidratos en las muestras obtenidas de los reactores. Las curvas de calibración se prepararon utilizando estándares de diferentes concentraciones de CMC y glucosa, disueltas en agua destilada, y se realizó también una curva en donde se consideraron los demás componentes del medio de cultivo (fuentes de carbono suplementarias) para determinar el nivel de respuesta y por lo tanto su contribución al total de la señal de carbohidratos encontrada para cada muestra. El intervalo de concentraciones para todas las curvas fue de 0.025 a 1 g L⁻¹.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Producción de biogás e H₂

El volumen de biogás producido se midió a través del método de desplazamiento de émbolo [4]. Este método consistió en inyectar una jeringa con aguja a través del septo del reactor y medir el volumen que se obtiene cuando la presión de biogás desplaza el émbolo.

La producción de biogás e hidrógeno, en la fase de operación de los reactores en modo lote, se cuantificó de forma acumulativa, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Producción (mL L}^{-1}\text{)} = P_a + P_t / V_r \quad (\text{Ec. 3})$$

Dónde: P_a es la producción acumulada de biogás o H₂ en mL, P_t es la producción de biogás o H₂ en mL a cualquier tiempo de operación durante la fase de operación en lote, y V_r es el volumen de trabajo del reactor en mL.

Por otro lado, para la fase de operación semicontinua de los reactores, comprendió el cálculo de productividad de biogás e H₂, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Productividad (mL L}^{-1}\text{d}^{-1}\text{)} = P / T_m / V_r \quad (\text{Ec. 4})$$

En dónde la P es la producción promedio de cada tratamiento en mL, T_m es el tiempo en días de operación en el que se tomó la muestra, y V_r es el volumen de trabajo del reactor en mL.

Asimismo, se calculó el porcentaje de H₂ en el biogás de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de H}_2 = \frac{(A_{H_2})(H_2 \text{ std})}{A_{H_2 \text{ std}}} \quad (\text{Ec 5})$$

En dónde A_{H_2} es la señal de área de H_2 de las muestras obtenida a partir del análisis por cromatografía, $H_{2\ std}$ es el volumen en mL de H_2 contenidos en la muestra estándar utilizada para la curva de calibración, y $A_{H_{2\ std}}$ es la señal de área obtenida a partir del análisis por cromatografía de la muestra estándar utilizada para la curva de calibración.

Con el objetivo de identificar el nivel de variación entre las muestras y entre los tratamientos, se determinó el coeficiente de variación (CV) tanto para la producción de biogás y como para la producción de H_2 , utilizando la desviación estándar y el promedio de las réplicas de acuerdo a cada variable. La ecuación para el coeficiente de variación se presenta a continuación:

$$CV = \sigma / \bar{n} \quad (100) \quad \text{Ec. (6)}$$

Dónde σ es la desviación estándar para las variables analizadas, y \bar{n} es el promedio de las réplicas para la variable en turno.

3.5.2 Caracterización de biogás por cromatografía de gases

3.5.2.1 Fundamento del método

La determinación de la composición del biogás se realizó por cromatografía de gases utilizando un detector de conductividad térmica (TCD, por sus siglas en inglés). Esta técnica permite el análisis rápido y exacto de gases, vapores y líquidos. Asimismo, permite identificar los componentes individuales de las mezclas gaseosas. Iniciada a finales de 1952, se ha desarrollado notablemente en separación, identificación y determinación de compuestos volátiles de puntos de ebullición de hasta 350 a 400°C. El método tiene las ventajas de ser sensible, rápido y sencillo, y suministra información cuantitativa exacta con cantidades pequeñas de muestra [5].

El fundamento del uso de TCD, es medir la conductividad térmica del gas portador, ocasionada por la presencia de sustancias eluidas. Su funcionamiento se basa en el hecho que la velocidad de pérdida de calor de un cuerpo caliente para un cuerpo más frío es proporcional, entre otros factores, a la conductividad térmica del gas que separa estos cuerpos. Un filamento metálico muy delgado (de W, Au o aleación W-Re) es calentado por el pasaje de una corriente eléctrica constante. Este filamento está colocado dentro de un orificio en un bloque metálico, calentado a una temperatura más baja que aquella del filamento, por donde el gas de arrastre proveniente de la columna pasa continuamente. Mientras pasa gas de arrastre puro por la celda, la proporción de pérdida de calor del filamento para el bloque es constante y la temperatura del filamento no varía. Cuando un componente es eluido de la columna, este sale mezclado con el gas de arrastre y pasa por el detector. Si la conductividad de esta mezcla es diferente de aquella del gas de arrastre puro, el filamento pasa a perder calor para el bloque en una proporción diferente de aquella del equilibrio [5] [6].

3.5.2.2 Preparación y análisis de las muestras

Las muestras fueron tomadas cuando la presión en el interior del reactor fue nivelada a la presión externa. La composición del biogás se determinó en un cromatógrafo de gases SRI 8610C equipado con un detector de conductividad térmica y dos columnas empacadas (una de 6' x 1/8' de silica gel empacada en acero inoxidable y una columna de 6' x 1/8'' de corte molecular 13X empacada en acero inoxidable). La temperatura del inyector y del detector fue de 90 °C y 150 °C, respectivamente. La temperatura de la columna varió de la siguiente manera: se inició con 40 °C y se mantuvo durante 4 minutos y después incrementó gradualmente de 40 °C a 110 °C a una tasa de 20 °C minuto⁻¹, donde la temperatura final se mantuvo durante 3 minutos. Se utilizó N₂ como gas acarreador a un flujo de 20 mL minuto⁻¹. El cromatógrafo determina hidrógeno, metano, oxígeno, dióxido de carbono y monóxido de carbono en la misma muestra.

3.5.3 Determinación de ácidos orgánicos volátiles (AOV)

3.5.3.1 Fundamento del método

La determinación de ácidos orgánicos volátiles se realizó con un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización por flama (FID, por sus siglas en inglés). La técnica cromatográfica con detector del tipo FID, se basa en la medida de las variaciones de la corriente de ionización en una llama oxígeno-hidrógeno debido a la presencia de sustancias eluídas [5] [7].

El funcionamiento básico del FID es de un quemador de hidrógeno/oxígeno, donde se mezcla el efluente de la columna (gas portador y analito) con hidrógeno. Inmediatamente, este gas mezclado se enciende mediante una chispa eléctrica, produciéndose una llama de alta temperatura. La mayoría de compuestos orgánicos al someterse a altas temperaturas pirolizan y se producen iones y electrones, que son conductores eléctricos. Este hecho se aprovecha estableciendo una diferencia de potencial en voltios entre la parte inferior del quemador y un electrodo colector situado por encima de la llama. El proceso de ionización que se da en la llama es complejo, pero se puede aproximar el número de iones producidos al número de átomos de carbono transformados en la llama. Esto produce que sea un detector sensible a la masa (al número de átomos de carbono que salen de la columna) más que a la concentración [5] [8].

3.5.3.2 Preparación y análisis de las muestras.

Se utilizó un equipo Agilent 7890B equipado con una columna capilar de HP-FFAP de sílice fundida con una longitud de 15 m y un diámetro interno de 0.15 mm. Las condiciones de temperatura del equipo fueron las siguientes: inyector 190 °C, horno a 60 °C, y la tasa de cambio fue de 15 °C por minuto hasta llegar a 90 °C, luego incrementó a 25 °C por minuto hasta llegar a 160 °C, y se mantuvo por 3.5 minutos. Se utilizó gas N₂ como gas acarreador, a una tasa de 2.5 mL minuto⁻¹ [9].

La preparación de la muestra se realizó mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se recuperó el sobrenadante y se filtró con acrodiscos de 0.2 μm . Se realizaron diluciones de 1:10 de las muestras para obtener concentraciones cercanas dentro de los límites de confiabilidad de acuerdo al equipo y a la curva de calibración realizada.

Las muestras se colocan en el tren de muestras adaptado al muestreador del equipo y se inyectan de forma automática. El equipo inyecta 2 μL de muestra para cada análisis.

3.5 REFERENCIAS DEL CAPÍTULO

- [1] Rice E.W., Baird R.B., Eaton A.D. & Clesceri L.S. (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd edición. APHA/AWWA/WEF, Washington, DC.
- [2] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, PA. & Smith, E. (1956). Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: pp. 350-356.
- [3] Cristancho, L. M., Monroy, R. A. (2014). Manual de métodos de generales para la determinación de carbohidratos. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, pp. 230-255.
- [4] Saripan, A.F., Reungsang, A. (2014). Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose for bio-hydrogen production by anaerobic mixed cultures in elephant dung. *Int. J. Hydrogen Energy*, 39, pp. 9028-9035.
- [5] Facultad de Química. (2007). Técnicas cromatográficas. Química analítica Instrumental, UNAM: México.
- [6] Olguín L., Rodríguez, H. M. (2004). Métodos en biotecnología. Cromatografía de gases, UNAM: Cd. México, México.
- [7] Serie Académicos CBS. (2000). Cromatografía de gases y de líquidos de alta resolución: México. pp. 215-231 y 255-305.
- [8] Guntuzweiny, J.S. (2000). Handbook of chromatography, general data and principles. Press Ed, EUA. pp. 1-25

- [9] Buitrón, G., Carvajal, C. (2010). Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresour. Technol.*, 101, pp. 9071–9077

CAPÍTULO CUATRO

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Producción de H₂ vía fermentación

4.1 Producción de H₂ vía fermentación

4.1.1 Operación de reactores en lote

En la operación de los reactores en lote se buscó promover el crecimiento de microorganismos productores de hidrógeno a partir de carboximetilcelulosa (CMC) mediante condiciones ambientales establecidas, que fueron a un pH inicial de 5.5 y una temperatura de 37 °C, con agitación moderada.

4.1.1.1 Producción de biogás e H₂

En la figura 8 se presenta la producción acumulativa de biogás y el volumen de H₂ obtenido durante los tres ciclos de operación. La producción acumulativa de biogás en el primer ciclo alcanzó los 1010 mL L⁻¹, sin embargo, no se detectó presencia de H₂. En el segundo ciclo la producción acumulativa de biogás disminuyó a 483 mL L⁻¹, pero hubo una producción de 3.1 mL L⁻¹ H₂.

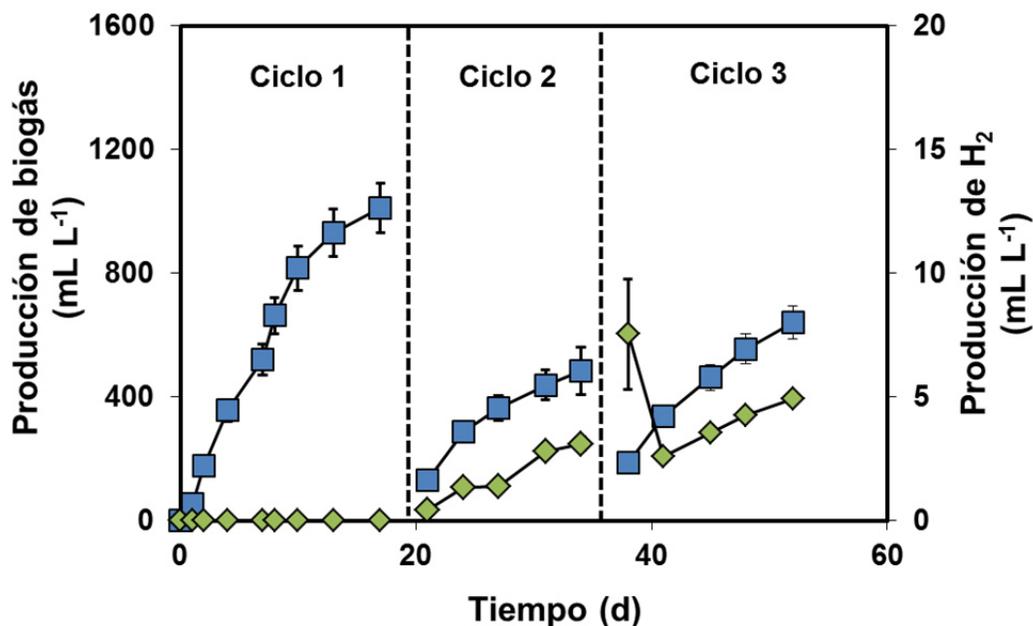


Figura 8. Producción acumulativa de biogás (■) e H₂ (◆) en cada ciclo durante la etapa de operación en lote.

Para el tercer ciclo se recuperó la producción de biogás y alcanzó los 640 mL L⁻¹, asimismo se observó un incremento en la producción de H₂ que alcanzó su máximo en los 7.7 mL L⁻¹. Cabe destacar que durante esta fase no se detectó presencia de metano en ninguna de las réplicas por lo que la adición de 2-bromoetanosulfonato de sodio fue efectiva a una concentración de 2.4 g L⁻¹ para inhibir la metanogénesis.

4.1.1.2 Consumo de sustrato

En la figura 9 se muestran los porcentajes de consumo de CMC al final de cada ciclo de operación, el cual aumentó de forma gradual. En el primer ciclo, las comunidades microbianas mostraron un consumo de CMC cercano al 50 %. De acuerdo a la dinámica poblacional en los reactores, la presión de selección para el uso de carboximetil celulosa como principal fuente de carbono promovió el establecimiento de especies microbianas capaces de metabolizar las complejas estructuras celulósicas. Este efecto se puede confirmar en el incremento porcentual a un 65 % en el consumo de celulosa al final del tercer ciclo de operación en modo lote.

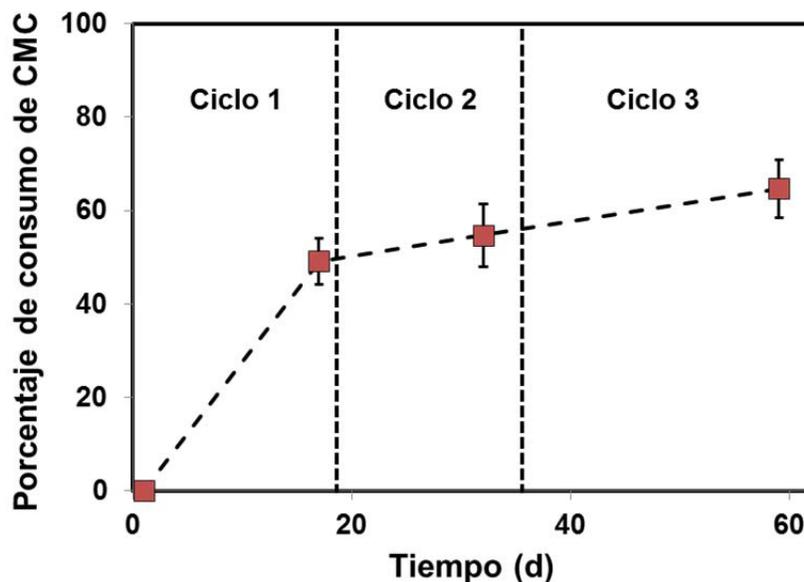


Figura 9. Porcentajes de consumo de sustrato (carboximetil celulosa) al final de cada ciclo de operación de reactores en lote.

4.1.1.3 Crecimiento celular

Por otro lado, el crecimiento celular en términos de sólidos suspendidos volátiles (SSV), presentó una tendencia de incremento durante los ciclos de operación (figura 10). La concentración de masa celular en el primer ciclo de operación, fue de 4.5 g SSV L^{-1} , la cual se incrementó en los siguientes dos ciclos de operación hasta alcanzar los 5.7 g SSV L^{-1} . Este incremento en la masa celular, así como lo observado para el consumo de CMC, nos permiten confirmar que en cada ciclo de operación se incrementó la eficiencia de transformación de sustrato en energía y biomasa.

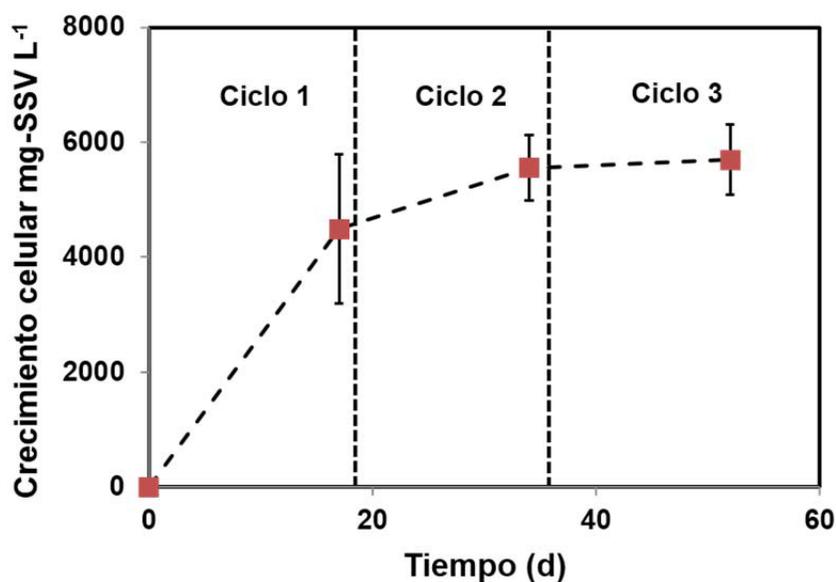


Figura 10. Crecimiento en masa celular en términos de SSV al final de los ciclos de operación en reactores en lote.

4.1.1.4 Producción de ácido orgánicos volátiles (AOV's)

La producción de ácidos orgánicos volátiles al final de los tres ciclos de operación se presenta en la figura 11. El primer ciclo se caracterizó por una baja producción de ácidos orgánicos, su acumulación en los reactores fue más evidente en el segundo y tercer ciclo. En el caso del acetato, su incremento fue alrededor de 10 veces del primer al tercer ciclo.

El propionato y butirato, se encontraron en mayor concentración después del acetato, e incrementaron su presencia del primer al tercer ciclo en 14 y 16 veces, respectivamente. Asimismo, a partir del segundo ciclo, se observó una mayor cantidad de ácidos orgánicos, con la presencia de valerato e iso-valerato en concentraciones de 1.0 y 1.3 g L⁻¹, al final del tercer ciclo, respectivamente. En menor cantidad (< 1.0 g L⁻¹) se detectaron el iso-butirato y el caproato.

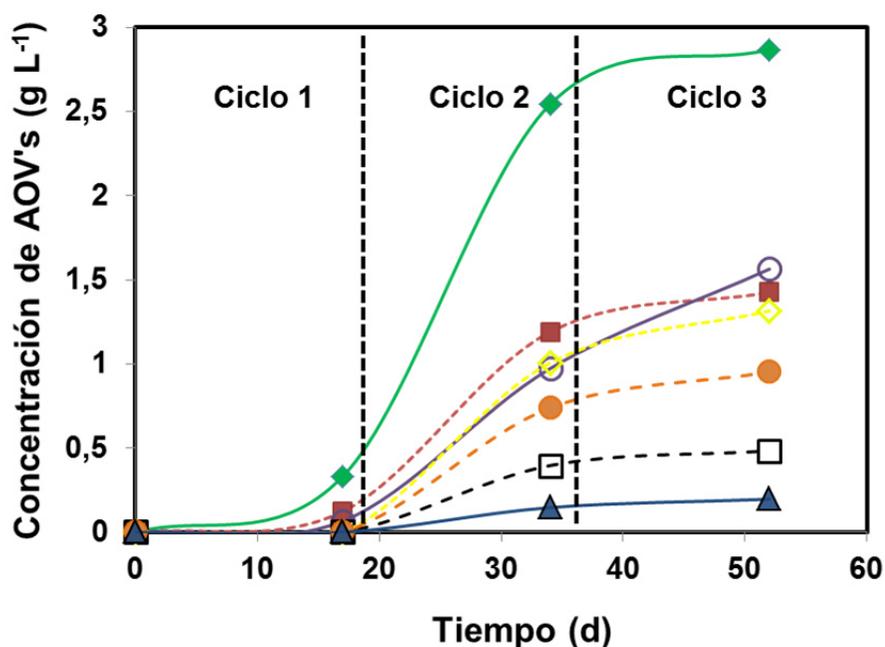


Figura 11. Producción de ácido orgánico volátiles (AOV's) al final de los tres ciclos de operación en reactores en lote. Acetato (◆), propionato (■), butirato (●), iso-butirato (□), valerato (◇), iso-valerato (○), caproato (▲).

La producción de H₂ aumentó de forma gradual en cada ciclo, lo que se acompañó con una acumulación de acético y butírico, metabolitos directamente ligados a la producción de H₂.

El crecimiento y consumo de sustrato también aumentaron con cada ciclo, lo que evidenció que parte de la comunidad microbiana inicial en el inóculo fue capaz de adaptarse y metabolizar la CMC como principal fuente de carbono.

Sin embargo, también se encontró la presencia de otros metabolitos como el propionato, valerato y caproato en concentraciones de hasta 1.5 g L^{-1} , lo que significa que la eficiencia en la producción de H_2 pudo ser disminuida ya que estos ácidos orgánicos se sintetizan a partir de rutas bioquímicas que requieren de H_2 [1] [2].

Al término de 60 días, se logró la producción de H_2 con CMC, por lo que los reactores continuaron alimentándose pero ahora en un modo semicontinuo.

4.1.2 Operación de reactores en modo semicontinuo

Se tuvieron dos tratamientos diferentes con cuatro réplicas cada uno que consistieron en establecer dos regímenes de pH. Para el primer tratamiento, que definimos como reactores con pH fijo, el pH de los reactores se mantuvo a un valor 5.5 ± 0.3 . En el segundo tratamiento, que definimos como reactores con pH variable, el pH de los reactores tuvo 2 regímenes de 7 días, un régimen con un pH de 5.5 ± 0.3 y otro régimen con un pH de 7.0 ± 0.4 . Estos dos regímenes se repitieron durante todo el tiempo de operación de los reactores. El fundamento del segundo tratamiento radica en permitir un crecimiento de más amplio espectro de especies microbianas. Al inicio de la operación de los reactores en modo semicontinuo, el pH de los dos regímenes se logró de forma gradual (figura 12).

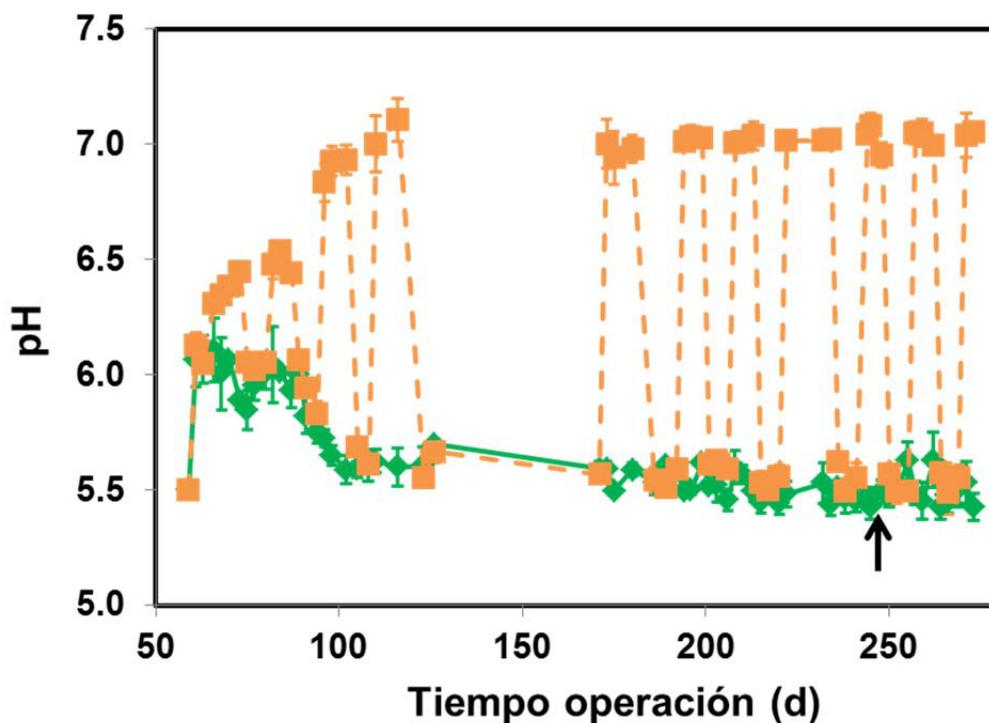


Figura 12. Valores de pH durante el período de operación de reactores semicontinuos. Tratamiento con pH fijo (◆) y pH variable (■). La flecha indica el día de operación en que se realizó la re-inoculación.

4.1.2.1 Producción de biogás e H₂

La producción de biogás para la fase de operación semicontinua de cada tratamiento se presenta en la figura 13. La producción de biogás presentó diferentes tendencias a lo largo de esta fase para ambos tratamientos. Se pueden identificar diferentes etapas operacionales en la producción de biogás en respuesta a la adaptación por parte de las comunidades microbianas a los cambios en el medio. Durante el arranque de los reactores semicontinuos, de los días 59 al 75 se presentó una etapa de inestabilidad definido como periodo de aclimatación por parte de las comunidades microbianas, en dónde se presenta un proceso de adaptación al nuevo modo de operación, en un sentido metabólico y de dinámica poblacional, que suele presentarse en sistemas biológicos [3] [4]. En este periodo, el tratamiento con pH fijo tuvo una productividad promedio de biogás de $61.6 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, el coeficiente de variación para los días dentro de este periodo de aclimatación fue de 16.4 %. Mientras que la productividad promedio de biogás para los reactores de pH variable fue de $53.6 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ con un coeficiente de variación de 26.3 %.

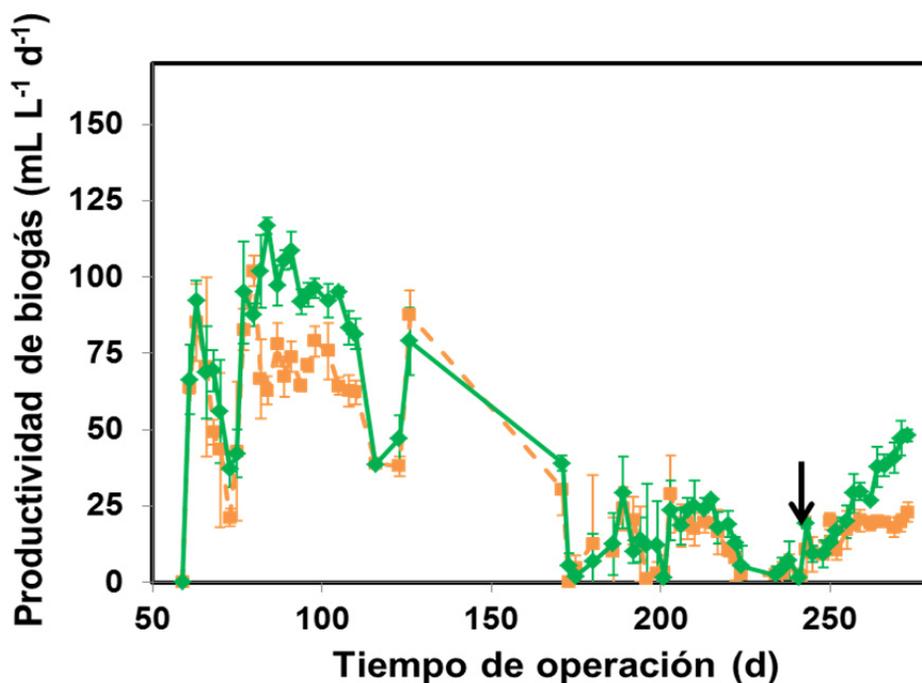


Figura 13. Productividad de biogás en fase de operación semicontinua. Tratamiento con pH fijo (◆) y pH variable (■). La flecha indica el día de operación en que se realizó la re-inoculación.

Después de la etapa de aclimatación, la operación de los reactores continuó hasta alcanzar la mayor productividad en la fase de operación semicontinua, en donde también se presentó la mayor estabilidad mostrada (coeficientes de variación menores al 10 %) por los reactores en ambos tratamientos. Esta etapa de estabilidad comprende del día 77 al día 110, durante el cual la productividad de biogás alcanzó valores promedio de $96 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, con un coeficiente de variación de 5.9 %, para el tratamiento con pH fijo. Mientras que para el tratamiento con pH variable, la productividad promedio durante esta etapa fue de $72.3 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, con un coeficiente de variación de 7.8 %. Por lo que el tratamiento con pH fijo tuvo un 25 % más productividad de biogás, durante la fase más estable de operación.

Cabe mencionar, que hasta el día 110 de tiempo de operación, el medio de alimentación contenía además de CMC, fuentes suplementarias de carbono, contenidas en las fuentes de nitrógeno, como la triptona, peptona y extracto de levadura. Estos nutrientes son de fácil utilización por las comunidades microbianas en comparación a la CMC. Las fuentes auxiliares de carbono y nitrógeno promueven el crecimiento microbiano en general, sin embargo, en este estudio se observaron dos desventajas respecto al uso de estos nutrientes. La primera se asoció al fenómeno de competencia por sustratos entre estas fuentes suplementarias y la CMC, y la segunda, que promovieron el crecimiento de bacterias sulfato reductoras (BSR), al presentar en su composición aminoácidos azufrados. Las BSR al desarrollarse en cultivos fermentativos son capaces consumir los electrones liberados durante las reacciones de fermentación dirigidos a la generación de H_2 [5]. Por lo tanto, a partir del día 116 de operación, se removieron las fuentes de carbono y nitrógeno suplementarias del medio de alimentación, dejando a la CMC como la única fuente de carbono, y se utilizó urea como fuente de nitrógeno.

El cambio de composición en el medio de cultivo tuvo un efecto directo sobre la producción de biogás para ambos tratamientos, este efecto resultó en una reducción cercana al 50 y 80 % de producción de biogás para los reactores con pH variable y pH fijo, respectivamente. La respuesta a la nueva composición del medio de cultivo, parecía tener una tendencia de recuperación en los días 116 a 126, sin embargo, a partir del día 126 y

hasta el 171 no se tienen datos por motivos de periodo vacacional, durante el cual los reactores no se operaron.

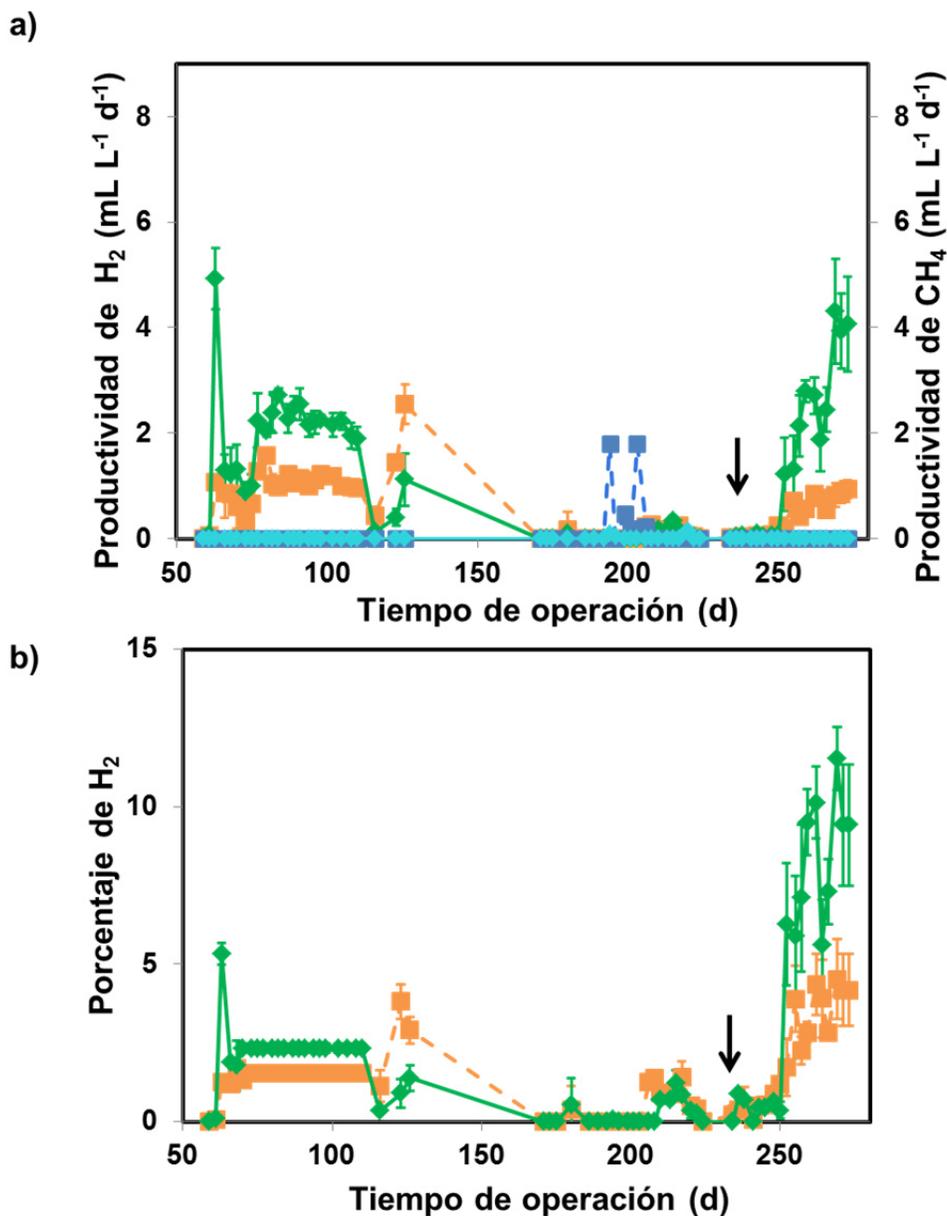


Figura 14. a) Productividad de hidrógeno y metano. b) Composición porcentual de hidrógeno y metano en biogás, durante la etapa de operación semicontinua. Producción de H₂ (◆) y metano (◆) con pH fijo. Producción de H₂ (■) y metano (■) con pH variable. La flecha indica el día de operación en que se realizó la re-inoculación.

En este período de 45 días, los reactores se almacenaron a ~ 4 °C. El período de almacenamiento en refrigeración fue útil para someter a estrés las comunidades microbianas presentes en los reactores y observar su resiliencia. Sin embargo, como se observa en la figura 10, los días de operación 171 al 241, se caracterizaron por una inestable producción de biogás, para ambos tratamientos, en donde la productividad de promedio fue de 12.9 y 15.6 mL L⁻¹ d⁻¹, con un coeficiente de variación del 50 % y 41 % para el tratamiento con pH variable y pH fijo, respectivamente. Esta etapa inestable es probable que se presentara como respuesta al cambio del medio de alimentación o bien, a que las comunidades microbianas en los reactores fueron sensibles al periodo de almacenamiento a ~ 4 °C.

Debido a la situación de inestabilidad y baja productividad de biogás e H₂, en todos los reactores, se realizó una re-inoculación de los mismos en el día 241 de operación, con un inóculo procedente de rumen de bovino. El mismo tipo de inóculo se utilizó para ambos tratamientos, con el objetivo de promover la actividad microbiana y continuar con el objetivo de evidenciar los efectos de cada tratamiento sobre los parámetros bioquímicos. El efecto de la re-inoculación, se observó al día 243, en donde se presentó una tendencia de incremento en ambos tratamientos, en comparación de los anteriores días de operación. La producción promedio de biogás del día 250 al 273, dentro de esta etapa de re-inoculación, se incrementó para ambos tratamientos, con producciones de 31.5 y 18.6 mL L⁻¹ d⁻¹, para los reactores con pH fijo y pH variable, respectivamente. Cabe mencionar que los reactores con pH variable, muestran una tendencia de estabilización que inicia en el día 255 de operación y se mantiene hasta el final de la toma de datos para este estudio, la cual fue hasta el día 273. Por otro lado, los reactores alimentados con pH fijo, continuaron la tendencia de incrementó hasta el día 273. Por lo que, en esta etapa, como en las anteriores, los reactores con pH fijo, mostraron más productividad de biogás, en este caso hasta un 41 % mayor en comparación a los reactores con pH variable.

Las tendencias identificadas en la producción de biogás, también se presentaron para la productividad y el porcentaje de H₂ en ambos tratamientos (figura 14). Durante la etapa de aclimatación, la productividad de H₂ fue mayor para el tratamiento con pH fijo,

con valores promedio de $1.5 \text{ mL}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ en comparación al pH variable que tuvo un promedio de $0.5 \text{ mL}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$, los coeficientes de variación fueron de 23 y 33 %, respectivamente. Resulta interesante observar que la tendencia de mayor productividad por parte de los reactores con pH fijo se mantuvo en la etapa de estabilidad, en donde la productividad de H_2 para pH fijo fue de $2.2 \text{ mL}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ en contra de $1.1 \text{ mL}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ de los reactores con pH variable, los coeficientes de variación fueron de 9 y 10 %, respectivamente. En cuanto a la composición de H_2 en el biogás, la etapa de aclimatación presentó porcentajes promedio de 2.3 % H_2 con un 15 % variación, y para la etapa de mayor estabilidad se mantuvo en el mismo porcentaje pero con un variación del 6 %. Por su parte, los reactores con pH variable, presentaron un porcentaje promedio de 1.2 % para la etapa de aclimatación y un coeficiente de variación del 11 %, mientras que para la etapa de mayor estabilidad los valores fueron de 1.6 % H_2 y 1.8 % de variación.

En la etapa correspondiente al cambio en la composición del medio de cultivo de alimentación, tanto la productividad de H_2 como los valores porcentuales del mismo en el biogás, tuvieron una disminución significativa, en ambos tratamientos, en donde se presentaron valores cercanos al límite de detección inferior. Además del efecto por el cambio en la composición del medio de cultivo de alimentación, la baja productividad de H_2 , se asocia a la presencia de BSR reportadas como consumidoras de H_2 . Su crecimiento tiene lugar a través de la presencia de fuentes de sulfato que pudieron obtener de las fuentes de carbono suplementarias (peptona, triptona y extracto de levadura). Las evidencias encontradas asociadas a la presencia de bacterias sulfato reductoras, fueron un fuerte olor a sulfuro de hidrógeno (principal producto final), y una coloración de precipitados de color negro, asociadas a la formación de sales de hierro por acción de su actividad reductora [6].

La etapa de re-inoculación, similar al comportamiento observado para biogás, tuvo un efecto positivo sobre la productividad y composición de H_2 en ambos tratamientos. En el día 252 de operación de los reactores, la productividad y composición porcentual de H_2 para los reactores con pH fijo fue de $1.21 \text{ mL}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ y 6.3 %, mientras que para los reactores con pH variable fue de $0.2 \text{ mL}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ y 1.7 %, respectivamente. Hasta el día 273 de operación, los reactores con pH fijo presentaron una productividad y una composición

porcentual de H₂ de 4.06 mL_{H₂} L⁻¹d⁻¹ y 9.4 %, respectivamente, mientras que para los reactores con pH variable fue de 0.9 mL_{H₂} L⁻¹d⁻¹ y 4.2 %, respectivamente. Si bien la tendencia de incremento porcentual en productividad de H₂, del día del inicio hasta el último día de operación en la etapa de re-inoculación, fue similar (~70 %) en ambos tratamientos, el pH fijo mostró una productividad 4.5 veces mayor, y una composición de H₂ en el biogás 2.3 veces mayor en comparación a los reactores con pH variable.

4.1.2.2 Crecimiento celular

Las determinaciones de crecimiento en biomasa microbiana en la etapa de operación semicontinua se presentan en la figura 15. Se puede observar que en los primeros días de operación de la fase II, se presentó una caída en el crecimiento microbiano, la cual puede atribuirse al cambio en el modo de operación de tipo lote al modo semicontinuo. Este cambio, representó una disminución del 66 y 63 % en biomasa microbiana, para los reactores con pH variable y pH fijo, respectivamente. En la etapa identificada como de mayor estabilidad, similar a las tendencias observadas en los parámetros bioquímicos previamente expuestos, de los días 77 al 105, el coeficiente de variación fue del 12 %. Después de esta etapa, el crecimiento se limitó debido al cambio en la composición del medio de cultivo de alimentación. Este efecto, puede explicarse como una selección más fuerte del medio hacia la comunidad microbiana en cada tipo de reactor. En donde, la evolución de estas comunidades tuvo como consecuencia un efecto limitante sobre el crecimiento de especies incapaces de utilizar la CMC o sus subproductos como única fuente de carbono y energía.

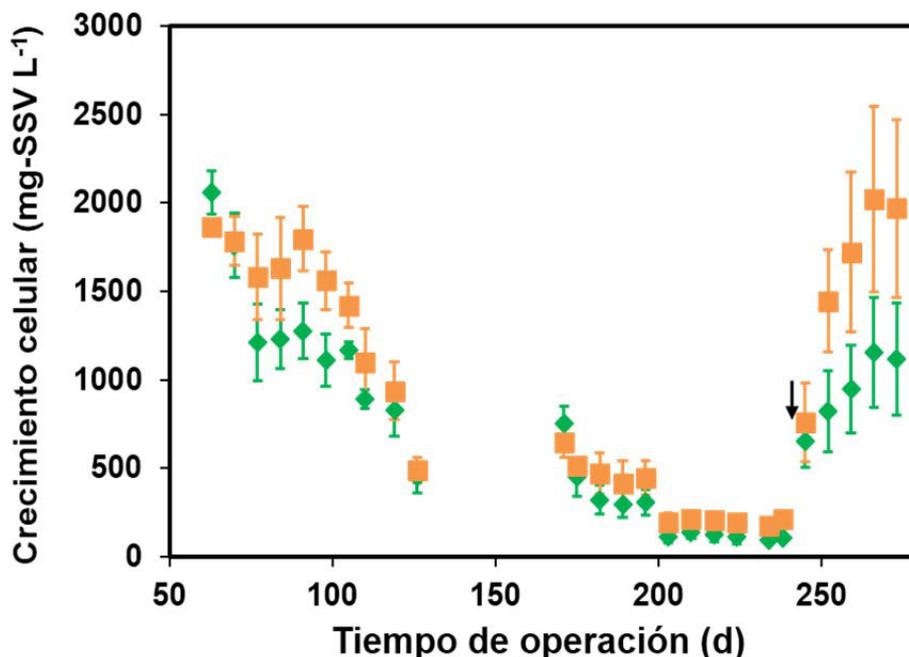


Figura 15. Crecimiento celular en la fase de operación semicontinua. La flecha indica el día de operación en que se realizó la re-inoculación.

En la etapa final de operación, después de la re-inoculación de los reactores, se observó un incremento importante en el crecimiento para ambos tratamientos. La comunidad microbiana presente en los reactores tanto de pH fijo como de pH variable al momento de la inoculación, tuvo una buena respuesta al medio y a las condiciones de operación, ya que a partir de la re-inoculación se observó un crecimiento en función del tiempo que logró su estabilización al alcanzar en promedio los 1,584 y 938.4 mg-SSV L⁻¹ para los reactores con pH variable y pH fijo, respectivamente. Para cada tratamiento las tendencias fueron similares, sin embargo, a lo largo de todo el tiempo de operación los reactores con pH variable presentaron mayor crecimiento microbiano. Esto puede asociarse a que las condiciones de régimen de pH de 5.5 a 7.0, permiten un crecimiento microbiano de más amplio espectro, dado que hay más oportunidad de crecimiento para más especies en comparación a un limitado valor de pH, como es el caso de los reactores con pH fijo. Lo anterior, de acuerdo al papel que juega el pH sobre el crecimiento en especies microbianas en donde se ha observado que diferentes gradientes de pH en distintos tipos de suelos tiene

un efecto sobre presencia o ausencia de especies, así como sobre las características de productividad [7][8]. Asimismo, se ha correlacionado esta variable con la estructura y función de comunidades microbianas en diferentes sistemas ambientales, como corrientes dulceacuícolas, glaciares y estacionales [9-12].

4.1.2.3 Consumo de sustrato

En la figura 16 se presentan los porcentajes de consumo de CMC durante la fase de operación semicontinua. Durante la fase I, los valores de consumo de CMC alcanzaron hasta un 65 %. Sin embargo, en los primeros días de operación y hasta el día 112, los porcentajes de consumo para ambos tratamientos presentaron una tendencia de decrecimiento llegando a porcentajes promedio de consumo de CMC de 38 y 34 % para pH variable y pH fijo, respectivamente.

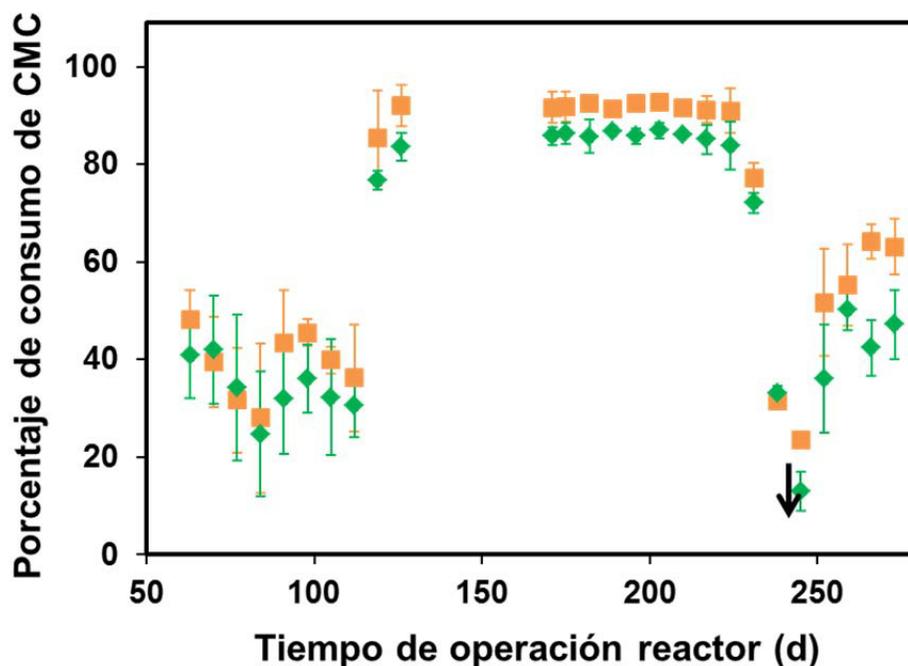


Figura 16. Consumo de CMC durante la fase de operación semicontinua. La flecha indica el día de operación en que se realizó la re-inoculación.

A partir del día 119 de operación, en donde tuvo inicio la operación de los reactores con la nueva composición del medio de alimentación, el consumo de CMC se incrementó de forma significativa alcanzando valores porcentuales promedio de 83.8 y 90.7 %, para los reactores de pH fijo y pH variable, respectivamente. Este efecto puede explicarse como una consecuencia de la remoción de las fuentes de carbono suplementarias, que al ser más fáciles de metabolizar por parte de las comunidades microbianas representaban un efecto de competencia por sustrato en donde la CMC tuvo un papel secundario. Cuando se remueven las fuentes suplementarias de carbono, la CMC se convierte en la única fuente de carbono y energía disponible en el medio. Esta condición, representa una presión de selección sobre las comunidades microbianas, de esta manera se condiciona la proliferación de especies capaces de utilizar CMC como única fuente de carbono y energía. Sin embargo, también presentó consecuencias negativas sobre el crecimiento microbiano como se observa en la figura 15.

Finalmente, de los días de operación 238 al 245 hubo una caída importante en el consumo de CMC, la cual se asocia con una etapa de inestabilidad que también se observó en la producción de biogás e H_2 , que posteriormente se sobrepasa con la re-inoculación de los reactores e inicia de nuevo un ascenso.

Además de los cambios observados en los porcentajes de consumo de sustrato a lo largo del tiempo de operación debido a las condiciones ambientales, también se observaron diferencias respecto al consumo de CMC entre los tratamientos. En general, los reactores con pH variable presentaron más actividad de consumo hacia la CMC. Los reactores con pH variable presentaron un 4 % más de consumo de CMC en la etapa previa al cambio de composición del medio de cultivo. Asimismo, cuando se presentó la mayor etapa de consumo de CMC, los reactores con pH variable presentaron un 7 % más consumo de CMC. Finalmente, después de la re-inoculación de los reactores, se observa una mejor respuesta de los reactores con pH variable al presentar un 58.6 contra un 44 % de consumo de los reactores con pH fijo.

Por otro lado, la degradación de celulosa reportada en la literatura presenta diferentes tendencias en función del tipo de inóculo. Wang *et al.*, [13] y Ren *et al.*, [14], en estudios similares, emplearon un cultivo mixto compuesto por *Clostridium acetobutylicum* y *Ethanoigenens harbinense*, en donde en el primero se reporta un 68 % de hidrólisis de celulosa microcristalina en un reactor de lote alimentado, y en el segundo un 70 % de hidrólisis de CMC utilizando reactores en lote. Nguyen *et al.*, [15] reportaron un 37 % de consumo, empleando un cultivo mixto con *Thermotoga maritima* y *Thermotoga neapolitana*. En un estudio más reciente, Saripan y Reungsang, [16] reportan un 75 % de consumo de CMC, utilizando un consorcio microbiano aislado de excreta de elefante, en reactores en lote, además, los análisis de identificación molecular mostraron como especies dominantes a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* y *Clostridium sp*, las cuales se asociaron a la mayor producción de H₂. Otras especies encontradas, en este estudio fueron *Lactobacillus parabuchneri* y *Lactobacillus rhamnosus*, asociadas a bajos rendimientos de H₂.

La variación en el consumo de CMC tiene una relación directa con el tipo de inóculo utilizado. En nuestro estudio, las comunidades microbianas obtenidas a partir de excreta de bovino presentaron una respuesta de consumo inicial similar a los reportados en la literatura. La evolución de estas comunidades microbianas al ejercer una presión al uso de CMC como única fuente de carbono y energía, tuvo un efecto positivo en el consumo de esta, que se observa más evidente en los reactores con pH variable (~89 %). Esto puede explicarse con la particularidad de que en nuestro estudio no se utilizó un tratamiento de eliminación de especies microbianas para inhibir la metanogénesis, por lo que las poblaciones de diferentes especies sufrieron menos alteraciones. Además, se sabe que para lograr una degradación de sustratos complejos o recalcitrantes como son los materiales celulósicos, se requiere de consorcios microbianos más que de cultivos puros o mixtos, para obtener mayores porcentajes de consumo.

4.1.2.4 Producción de ácidos orgánicos volátiles

La producción de ácidos orgánicos volátiles (AOV's) para ambos tratamientos en la etapa de operación semicontinua se presenta en la figura 17. En comparación a la fase I, el inicio de la fase II para ambos tratamientos, se caracterizó por presentar una menor producción de AOV's. Por ejemplo, en el caso del ácido acético la producción fue un 50 % menor, y para los reactores con pH variable el porcentaje de disminución para el mismo ácido orgánico fue de 56 %. Lo anterior puede deberse a la etapa de aclimatación por parte de las comunidades microbianas comprendida del día 59 al 77.

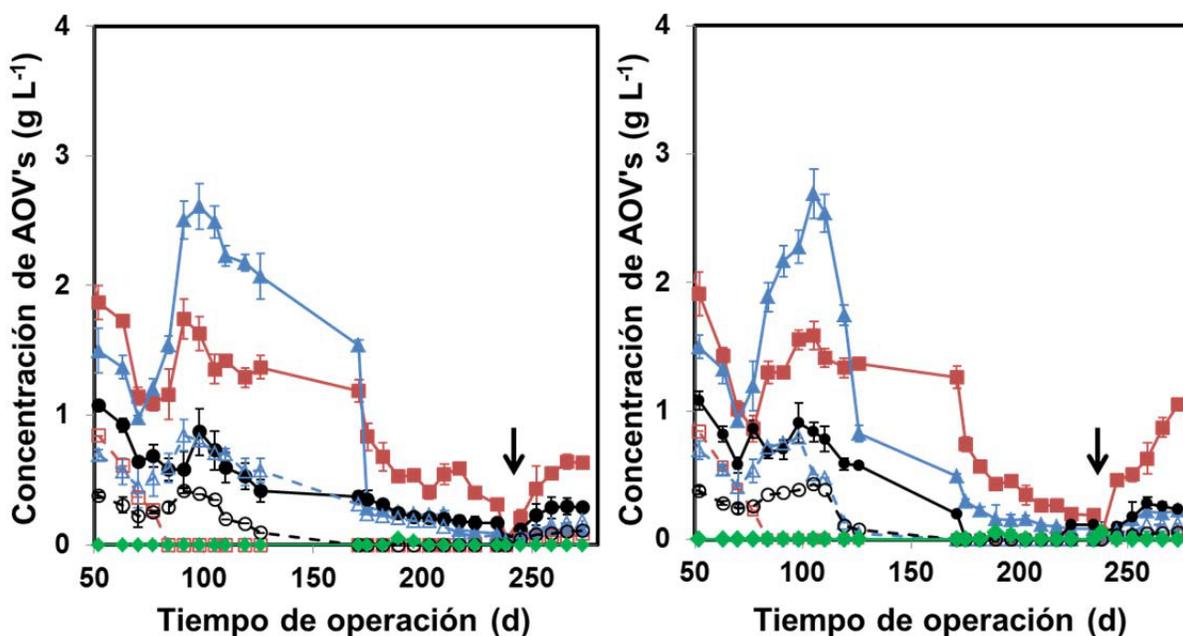


Figura 17. Producción de ácidos orgánicos (der.) tratamiento pH fijo, (izq.) tratamiento pH variable. Acetato (■), butirato (▲), propionato (●), valerato (◻), iso-valerato (△), iso-butyrate (○), etanol (◆). La flecha indica el día de operación en que se realizó la re-inoculación.

Otro efecto observado debido al cambio de modo de operación de los reactores sobre la producción de AOV's, fue el cambio de ruta fermentativa, la cual había estado dirigida a la producción de ácido acético como principal producto, sin embargo, a partir del día 77 se presenta el ácido butírico como principal producto final de la fermentación. Este ácido orgánico incrementó su producción de 1.4 a 2.5 g L⁻¹ en los reactores con pH variable y de 1.3 a 2.7 g L⁻¹ en los reactores con pH fijo, en los días de operación del 63 al 105. Cabe mencionar que para el caso de los reactores con pH variable, el ácido butírico se mantuvo como el principal producto de la fermentación hasta el día 171 de operación. Por su parte, los reactores con pH fijo, mantuvieron esta tendencia solo hasta el día 126 de operación, a partir del cual, el ácido acético fue nuevamente el subproducto principal de la fermentación.

Como en anteriores parámetros bioquímicos, la etapa de operación posterior al almacenamiento, comprendida entre los días 171 al 238, se caracterizó por una baja productividad de ácidos orgánicos. Esta reducción de la productividad puede deberse como se mencionó anteriormente, a un periodo de inestabilidad en donde los reactores de ambos tratamientos presentaron producciones de acetato con un porcentaje de reducción de 25 y 41 %, mientras que para el butirato el porcentaje de reducción fue de un 80 y 40 %, para los reactores de pH variable y pH fijo, respectivamente. Para el día 238 la producción de ácidos orgánicos tuvo una etapa crítica en donde se presentó la menor producción de ácido acético y ácido butírico con un 0.03 y 0.04 g L⁻¹ para los reactores de pH variable y de 0.04 y 0.06 g L⁻¹ para los reactores con pH fijo, respectivamente.

Después de la etapa crítica los reactores fueron re-inoculados. El efecto de la re-inoculación se observó de forma inmediata sobre la producción de ácidos orgánicos y al día 273 de operación, los valores de acetato alcanzaron valores de 0.6 y 1.1 g L⁻¹, para los reactores de pH variable y pH fijo, respectivamente. Por otro lado, el butirato no presentó la misma tendencia de recuperación, debido a que su producción se estableció en valores de 0.1 y 0.2 g L⁻¹ para los reactores con pH variable y pH fijo, respectivamente.

Por lo tanto, las variaciones en la producción de acetato y butirato, ácidos orgánicos que representan rendimientos de H_2 , se presentaron de forma diferente para cada tratamiento. En la etapa más estable, las diferencias entre ambos fueron de 5 y 2 % para ácido acético y ácido butírico, respectivamente. Sin embargo, se puede ver que durante el tiempo de operación se presenta un periodo más extenso y de mayor producción de butirato en los reactores con pH variable en comparación a los reactores con pH fijo. Por su parte los reactores con pH fijo presentaron un periodo más extenso y de mayor producción de ácido acético. Lo anterior, puede asociarse a la mayor producción de H_2 por parte de los reactores con pH fijo durante la mayor parte del tiempo de la fase de operación semicontinua, de acuerdo a los rendimientos que representa cada ácido orgánico como producto final de la fermentación, que para el caso del ácido acético es de 4 moles de H_2 y para el butirato es de 2 moles de H_2 por mol producido [1] [17].

Sin embargo, se presentaron algunas inconsistencias referentes a la relación de los rendimientos de H_2 con la ruta fermentativa (producción de AOV). Por ejemplo, el hecho de que al final de la fase I e inicio de la fase II, se presentó una mayor producción de acetato en comparación a los días restantes de la operación de los reactores, principalmente en los reactores con pH fijo. Sin embargo, esta mayor producción de ácido acético no se reflejó en la productividad de H_2 . Por otro lado, después de la re-inoculación de los reactores se produjeron los mayores rendimientos de H_2 , aun cuando la concentración de acetato y butirato, no fue mayor a la alcanzada en previas etapas del proceso. Sea que esto se presente como un reflejo de la actividad antagónica de las bacterias sulfato reductoras al consumir H_2 o bien, a la producción de acetato por vía homoacetogénica conocida como la ruta Wood-Ljungdahl [18] [19] permanece aún desconocido.

Una diferencia más entre los tratamientos es que en diferentes periodos de operación de los reactores, se presentó una mayor diversidad de ácidos orgánicos para los reactores con pH variable, esto puede asociarse a una estructura más compleja en las comunidades microbianas presentes en estos reactores, y que por este motivo existiera una mayor diversidad de productos finales en las rutas fermentativas. Lo anterior, sin embargo, con consecuencias directas en la productividad de H_2 .

4.3 REFERENCIAS DEL CAPÍTULO

- [1] Valdez, I., & Poggi, H.M. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renew. Sustain. Energy Rev*, 13 (5) pp. 1000–1013.
- [2] Motte J.C., Trably E., Escudie R., Hamelin J., Steyer J.P. & Bernet N. (2013) Total solids content: a key parameter of metabolic pathways in dry anaerobic digestion. *Biotechnol Biofuels*, 6, pp. 164-172.
- [3] Gao, W.J., Leung, K.T., Qin, W.S., Liao, B.Q. (2011). Effects of temperature and temperature shock on the performance and microbial community structure of a submerged anaerobic membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.*, 102, pp. 8733–8740
- [4] Gadow, S.I., Jiang, H., Watanabe, R., Li, Y.Y. (2013). Effect of temperature and temperature shock on the stability of continuous cellulosic-hydrogen fermentation. *Bioresour. Technol.*, 142, pp. 304–311.
- [5] Bundhoo, M.A., Mohee, R. (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *Int. J. Hydrogen Energy*, 41, pp. 6713-6733.
- [6] Muyzer, G., Stams, A.J.M. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 6, pp. 441-454.
- [7] Rousk, J., Brookes, P.C., Bååth, E. (2010). The microbial PLFA composition as affected by pH in an arable soil. *Soil Biol. Biochem.*, 42, pp. 516-520.
- [8] Rousk, J., Brookes, P.C., Bååth, E. (2010). Investigating the mechanisms for the opposing pH relationships of fungal and bacterial growth in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 42, pp. 926-934.
- [9] Fierer, N, Morse, J.L., Berthrong, S.T., Bernhardt, E.S., Jackson, R.B. (2007). Environmental controls on the landscape-scale biogeography of stream bacterial communities. *Ecology*, 88: (9), pp. 2162-2173.

- [10] Wilhelm, L., Singer, G.A., Fasching, C., Battin, T.J. & Besemer, K. (2013). Microbial biodiversity in glacier-fed streams. *The ISME Journal*, 7, pp. 1651–1660.
- [11] Heino, J., Tolkkinen, M., Pirttila, A.M., Aisala, H., Mikra H. (2014). Microbial diversity and community-environment relationships in boreal streams. *J. Biogeogr.*, 41, pp. 2234–2244.
- [12] Besemer, K. (2015). Biodiversity, community structure and function of biofilms in stream ecosystems. *Resear. Microbiol.*, 166, pp. 774-781.
- [13] Wang, A., Ren, N., Shia, Y., Lee, D.J. (2008). Bioaugmented hydrogen production from microcrystalline cellulose using co-culture—*Clostridium acetobutylicum* X9 and *Ethanoigenens harbinense* B49. *Int. J. Hydrogen Energy*, 33, pp. 912-917.
- [14] Ren, N., Wang, A., Gao, L., Xin, L., Lee, D.J. Su, A. (2008). Bioaugmented hydrogen production from carboxymethyl cellulose and partially delignified corn stalks using isolated cultures. *Int. J. Hydrogen Energy*, 33, pp. 5250 – 5255.
- [15] Nguyena, T.A.D., Kima, J.P., Kimb, M.S., Ohb, Y.K., Sima, S.J. (2008). Optimization of hydrogen production by hyperthermophilic eubacteria, *Thermotoga maritima* and *Thermotoga neapolitana* in batch fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy*, 33, 1483–1488.
- [16] Saripan, A.F., Reungsang, A. (2014). Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose for bio-hydrogen production by anaerobic mixed cultures in elephant dung. *Int. J. Hydrogen Energy*, 39, pp. 9028-9035.
- [17] Dahiya, S., Sarkar, O., Swamy, Y.V., Mohan, S.V. (2013). Acidogenic fermentation of food waste for volatile fatty acid production with co-generation of biohydrogen. *Bioresour. Technol.*, 182, pp. 103–113.
- [18] Ragsdale, S.W., & Pierce, E. (2008). Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl Pathway of CO₂ Fixation. *Biochim Biophys Acta*, 1784 (12): pp. 1873–1898.

- [19] Saady N.M.C. (2013). Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *Int. J. Hydrogen Energy*, 38, pp. 13172-13191.

CAPÍTULO CINCO

5.1 Conclusiones

5.1 CONCLUSIONES

Durante la fase de operación de reactores en lote, se logró aclimatar un consorcio microbiano que pudo utilizar CMC como principal fuente de carbono y energía. Durante el segundo y tercer ciclo de operación de esta fase, se observó la producción de H₂, y la acumulación de acetato y butirato como subproductos solubles de fermentación.

La fase de operación de los reactores en modo semicontinuo, consistió en definir una variación entre los reactores, en donde cuatro fueron operados con un pH variable (5.5 ± 0.3 a 7.0 ± 0.4), y otros cuatro reactores fueron operados con un pH fijo (5.5 ± 0.3). Durante esta fase de operación, se presentó la etapa de mayor estabilidad de los reactores (coeficiente de variación menor a 10 %). En esta etapa se observaron diferencias en la productividad de biogás, en donde bajo un régimen de pH fijo se logró una productividad promedio de $96 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, y bajo un régimen de pH variable se alcanzó una productividad promedio de $72 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Por lo que el tratamiento con pH fijo tuvo un 25 % más productividad de biogás, durante la fase más estable de operación.

Después de la re-inoculación realizada a los dos tratamientos de reactores en el día 241 de operación, la respuesta en términos de productividad de H₂ y composición en el biogás, fue positiva para ambos tratamientos, siendo mayor para los reactores de pH fijo que para los reactores de pH variable. Por lo que, los reactores con pH fijo fueron más eficientes en transformar la celulosa a H₂.

Es necesario, realizar estudios de identificación de los microorganismos presentes en los reactores para cada tratamiento, de esta forma se podrían asociar las diferencias en los parámetros bioquímicos con la composición y estructura de las comunidades microbianas y así incluir conceptos de estabilidad y productividad que pudieran darnos más elementos para comprobar la hipótesis del estudio.