



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

***EFFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES  
SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN UN PROCESO  
FOTOFERMENTATIVO***

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:  
**RENÉ CARDEÑA DÁVILA**

TUTOR PRINCIPAL  
**DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ**, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR  
**DRA. GEORGINA FERNÁNDEZ VILLAGÓMEZ**, FACULTAD DE QUÍMICA  
**DRA. GABRIELA MOELLER**, IMTA

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE 2013

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dra. Georgina Fernández Villagómez  
Secretario: Dra. Gabriela Eleonora Moeller Chávez  
Vocal: Dra. Katy Juárez López  
1<sup>er</sup>. Suplente: M. C. Gloria Moreno Rodríguez  
2<sup>do</sup>. Suplente: Dr. Germán Buitrón Méndez

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas,  
Instituto de Ingeniería, Unidad Académica de Juriquilla, Querétaro, Qro.

**TUTOR DE TESIS:**

Dr. Germán Buitrón Méndez

---

**FIRMA**

Esta investigación fue financiada por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-UNAM) en el marco del proyecto IT100113

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (324421) y del Instituto de Ingeniería UNAM.

A la M.C. Gloria Moreno Rodríguez y al M.C. Jaime Pérez Trevilla por la asistencia técnica y los análisis brindados en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas, Instituto de Ingeniería, Querétaro, Qro.

*A mis padres que me han apoyado en todo momento,  
que siempre han creído en mí y con los que estoy muy  
agradecido por todo lo que me han dado. Los amo.*

*A mis hermanos por el afecto que me brindan,  
espero ser un buen ejemplo para ustedes.*

*A JJ por ser el motor que me impulsa a  
superarme cada día y por compartir  
mis sueños y aspiraciones*

## ***AGRADECIMIENTOS***

Al Dr. Germán Buitrón Méndez, por haberme brindado la gran oportunidad de trabajar a su lado y permitirme ser parte de su grupo de trabajo. Por sus conocimientos e invaluable consejos aportados a lo largo de estos dos años y sobre todo por seguir creyendo en mí.

A la M.C. Gloria Moreno que fue participe de este proyecto y siempre estuvo ahí para brindarme su apoyo en los momento más críticos.

Al M.C. Jaime Pérez que siempre estuvo ahí para ayudarme en el laboratorio y haciendo amenas las jornadas de trabajo.

Al Dr. Alejandro Vargas Casillas, por los conocimientos que apporto a mi formación como maestro y por los comentarios positivos que siempre nos hace.

A la Dra. Georgina Fernández, Dra. Gabriela Moeller y Dra. Katy Juárez por sus importantes comentarios y aportaciones para poder concluir con éxito este proyecto.

A Jacobo por todo lo que me ha enseñado, por su apoyo moral, por sus regaños y por ayudarme cuando lo he necesitado.

A mi amiga incondicional Ángeles que fue cómplice a distancia, que me dio posada en las visitas a Ciudad Universitaria y me ha brindado siempre su apoyo. Gracias mejor amiga.

A mi gran amiga Dianita que siempre la estuve molestando con favores pero aprovechábamos para convivir.

A mis camaradas del alma Gerardito, Cristi, Sonia y Clarita que han dejado una marca en mí. Hacemos un gran equipo.

**CONTENIDO**

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS.....	4
<b>CAPÍTULO I</b>	
GENERALIDADES.....	5
1.1 PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO .....	5
1.1.1 Producción de biohidrógeno .....	5
1.2 PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO POR MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS (FOTOFERMENTACIÓN) .....	6
1.3 BACTERIAS PÚRPURA NO AZUFRADAS.....	8
1.3.1. Fotosíntesis en las bacterias púrpuras no azufradas.....	11
1.3.2 Fotoproducción de hidrógeno .....	12
1.3.3 Aislamiento y enriquecimiento de bacterias púrpura no azufradas .....	14
1.4 CRECIMIENTO BACTERIANO .....	15
1.4.1 Medida de la masa microbiana: Densidad óptica .....	17
1.5 MODELO DE GOMPERTZ .....	18
<b>CAPÍTULO II</b>	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
2.1 MATERIALES .....	20
2.2 MEDIOS DE CRECIMIENTO .....	20
2.2.1 Medio de crecimiento .....	20
2.2.2 Medio de producción de hidrógeno .....	20
2.3. INÓCULOS .....	21
2.3.1 Selección de inóculo .....	21
2.3.2 Curva de SST vs absorbancia .....	22
2.3.3 Curva de crecimiento .....	22
2.3.4 Tinción y observación en el microscopio .....	23

2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	23
2.4.1 Box-Behnken .....	23
2.4.2 Central compuesto .....	26
2.5 Pruebas preliminares en reactor de panel plano .....	28
2.6 PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS .....	28
2.6.1 Determinación de la concentración de biogás .....	28
2.6.2 Determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles .....	29
2.6.3. Nitrógeno amoniacal (N-NH <sub>3</sub> ).....	29
2.6.4. Demanda química de oxígeno (DQO) .....	30
2.6.5. Sólidos suspendidos totales .....	30
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
3.1 SELECCIÓN DE INÓCULO.....	31
3.1.1 Curva de calibración para sólidos suspendidos totales .....	36
3.1.2 Curva de crecimiento .....	36
3.1.3 Características de la comunidad microbiana .....	38
3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	39
3.2.1 Box-Behnken .....	39
3.2.1.1 Optimización de respuesta del diseño experimental Box-Behnken .....	50
3.2.2 Central Compuesto .....	51
3.2.2.1 Optimización de respuesta del diseño experimental Central Compuesto .....	62
3.3 PRUEBAS PRELIMINARES EN REACTOR DE PANEL PLANO .....	63
CONCLUSIONES.....	64
PRODUCTOS GENERADOS .....	65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Esquema de producción de hidrógeno en dos etapas.....	7
<b>Figura 1.2</b> Ejemplos de varios géneros de bacterias púrpura no azufradas. a) <i>Phaeospirillum fulvum</i> , b) <i>Rhodoblastus acidophilus</i> , c) <i>Rhodobacter sphaeroides</i> , d) <i>Rhodopila globiformis</i> , e) <i>Rhodocyclus purpureus</i> , f) <i>Rhodomicrobium vannielii</i> (Madigan M. et al., 2009).....	9
<b>Figura 1.3.</b> Proceso de producción de hidrógeno en bacterias púrpura no azufradas adaptada de Dasgupta et al., 2010.....	13
<b>Figura 1.4</b> Fases del crecimiento microbiano (Madigan M. et al., 2009).....	17
<b>Figura 1.5.</b> Las medidas de turbidez se realizan en un espectrofotómetro La fotocélula mide la luz incidente no dispersada por las células en suspensión y da lecturas de densidad óptica o unidades fotométricas (Madigan M. et al., 2009).....	18
<b>Figura 2.1.</b> Diagrama metodológico y experimental empleado para el cultivo de la bacteria púrpura no azufrada y la producción de hidrógeno a partir de la misma.....	
<b>Figura 2.2.</b> Selección de inóculo productor de hidrógeno a partir de 3 diferentes fuentes de origen.....	21
<b>Figura 2.3.</b> Estrategia experimental de curva de crecimiento del inóculo de bacterias púrpura no azufradas.....	22
<b>Figura 2.4.</b> Estrategia experimental usada en el desarrollo del diseño experimental Box-Behnken.....	25
<b>Figura 2.5.</b> Estrategia experimental usada en el desarrollo del diseño central compuesto.....	27
<b>Figura 2.6.</b> Montaje de fotobiorreactor.....	28
<b>Figura 3.1.</b> Primera fase del crecimiento, la botella de la izquierda contiene acetato y la de la derecha acetato y butirato como fuente de carbono. a) Soluciones de crecimiento, b) SBE c) FN y d) UASB.....	
<b>Figura 3.2.</b> Montaje experimental para la selección del consorcio fotosintético productor de hidrógeno.....	32
<b>Figura 3.3.</b> Coloraciones presentadas por las 3 fuentes de inóculo con las 2 estrategias de crecimiento (izquierda: acetato, derecha: acetato-butirato) a tiempos de 72 y 96 h de iniciado el crecimiento.....	33
<b>Figura 3.4.</b> Curvas de producción de hidrógeno ajustadas a Gompertz usando únicamente como fuente de carbono acetato para las 3 fuentes de inóculo: SBE (▲), FN (◆) y UASB (×).....	34



<b>Figura 3.5.</b> Curvas de producción de hidrógeno ajustadas a Gompertz usando como fuente de carbono una mezcla acetato-butirato para las 3 fuentes de inóculo: SBE (■), FN (●) y UASB (+).....	34
<b>Figura 3.6.</b> Curva de calibración de sólidos suspendidos totales contra absorbancia a una longitud de onda de 660 nm.....	36
<b>Figura 3.7.</b> Curva de crecimiento exponencial del consorcio enriquecido con bacterias púrpura no azufradas. ....	37
<b>Figura 3.8.</b> Microfotografías con tinción de Gram. A la izquierda alta relación C/N y a la derecha baja relación C/N.....	38
<b>Figura 3.9.</b> Curvas de producción de hidrógeno ajustadas a Gompertz del diseño experimental Box- Behnken para las pruebas: 1 (◆), 2 (▲), 3 (●), 4 (×) y 5 (■).....	40
<b>Figura 3.10.</b> Curvas de producción de hidrógeno ajustadas a Gompertz del diseño experimental Box- Behnken para las pruebas: 6 (◆), 7 (▲), 8 (●), 9 (×) y 10 (■).....	40
<b>Figura 3.11.</b> Curvas de producción de hidrógeno ajustadas a Gompertz del diseño experimental Box- Behnken para las pruebas: 6 (◆), 7 (▲), 8 (●), 9 (×) y 10 (■).....	41
<b>Figura 3.12.</b> Gráficas de residuos para $H_{max}$ .....	43
<b>Figura 3.13.</b> Gráfica de contorno y de superficie de respuesta para $H_{max}$ que muestra el efecto interactivo de la concentración de ácido acético y la concentración de ácido butírico.....	44
<b>Figura 3.14.</b> Gráfica de contorno y de superficie de respuesta para $H_{max}$ que muestra el efecto interactivo de la concentración de ácido acético y la concentración de ácido propiónico. ....	45
<b>Figura 3.15.</b> Gráfica de contorno y de superficie de respuesta para $H_{max}$ que muestra el efecto interactivo de la concentración de ácido butírico y la concentración de ácido propiónico.....	45
<b>Figura 3.16.</b> Gráficas de residuos para $R_{max}$ . ....	47
<b>Figura 3.17.</b> Gráfica de contorno y de superficie de respuesta para $H_{max}$ que muestra el efecto interactivo de la concentración de ácido acético y la concentración de ácido butírico.....	48
<b>Figura 3.18.</b> Gráfica de contorno y de superficie de respuesta para $H_{max}$ que muestra el efecto interactivo de la concentración de ácido acético y la concentración de ácido propiónico.....	48
<b>Figura 3.19.</b> Gráfica de contorno y de superficie de respuesta para $H_{max}$ que muestra el efecto interactivo de la concentración de ácido butírico y la concentración de ácido propiónico.....	49
<b>Figura 3.20.</b> Botellas serológicas al final de las 394 h que duró la actividad experimental.....	50

<b>Figura 3.21.</b> Curvas de producción de hidrógeno ajustadas a Gompertz de los 5 puntos centrales del diseño experimental central compuesto pruebas: 3 (■), 8 (◆), 9 (▲), 10 (×) y 13 (●).....	52
<b>Figura 3.22.</b> Curvas de producción de hidrógeno ajustadas a Gompertz del diseño experimental Central-Compuesto para las pruebas: 1 (◆), 2 (●), 4 (■) y 5 (▲).....	52
<b>Figura 3.23.</b> Curvas de producción de hidrógeno ajustadas a Gompertz del diseño experimental Box- Behnken para las pruebas: 6 (■), 7 (▲), 11 (◆) y 12 (●).....	53
<b>Figura 3.24.</b> Gráficas de residuos para $H_{max}$ . .....	55
<b>Figura 3.25.</b> Gráfica de contorno y de superficie de respuesta para $H_{max}$ que muestra el efecto interactivo de la concentración de ácido acético y la concentración de ácido butírico.....	56
<b>Figura 3.26.</b> Gráficas de residuos para $R_{max}$ .....	57
<b>Figura 3.27.</b> Gráfica de contorno y de superficie de respuesta para $R_{max}$ que muestra el efecto interactivo de la concentración de ácido acético y la concentración de ácido butírico.....	58
<b>Figura 3.28.</b> Botellas serológicas al final de las 697 h que duró la actividad experimental.....	60
<b>Figura 3.29.</b> Gráfica de pH para las muestras: 5 (■), 6(●) y 3(▲). Después de cada medición el pH era ajustado a 6.8 (línea punteada).....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Mecanismos de producción de biohidrógeno.....	6
<b>Tabla 2.1.</b> Valores empleados en diseño experimental Box Behnken.....	24
<b>Tabla 2.2.</b> Corridas arrojadas por el diseño Box-Behnken usando el Minitab 15.....	24
<b>Tabla 2.3.</b> Valores empleados en diseño experimental Central Compuesto.....	26
<b>Tabla 2.4.</b> Corridas arrojadas por el diseño central compuesto usando el Minitab 15.....	27
<b>Tabla 3.1.</b> Producciones y velocidades obtenidos con los 3 diferentes inóculos.....	35
<b>Tabla 3.2.</b> Diseño experimental Box-Behnken con los valores de $H_{max}$ , $R_{max}$ y tiempos de latencia ajustados a Gompertz.....	39
<b>Tabla 3.3.</b> Coeficientes de regresión estimados de $H_{max}$ .....	42
<b>Tabla 3.4.</b> Análisis de varianza de $H_{max}$ .....	44
<b>Tabla 3.5.</b> Coeficientes de regresión estimados de $R_{max}$ .....	46
<b>Tabla 3.6.</b> Análisis de varianza de $R_{max}$ .....	47
<b>Tabla 3.7.</b> Valores obtenidos al final del diseño experimental Box-Behnken.....	50
<b>Tabla 3.8.</b> Diseño experimental Central-Compuesto con los valores de $H_{max}$ , $R_{max}$ y tiempo de latencia ajustados a Gompertz.....	51
<b>Tabla 3.9.</b> Coeficientes de regresión estimados de $H_{max}$ .....	54
<b>Tabla 3.10.</b> Análisis de varianza de $H_{max}$ .....	55
<b>Tabla 3.11.</b> Coeficientes de regresión estimados de $R_{max}$ .....	56
<b>Tabla 3.12.</b> Análisis de varianza de $H_{max}$ .....	57
<b>Tabla 3.13.</b> Resultados obtenidos al final del diseño experimental Central Compuesto...	59
<b>Tabla 3.14.</b> Variación del pH durante la experimentación.....	61

## RESUMEN

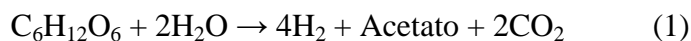
El hidrógeno se proyecta como alternativa energética. La producción biológica de hidrógeno se considera la ruta más viable. La fermentación en fase luminosa resulta una buena alternativa debido a la pureza del biogás generado. Se evaluó la influencia de una mezcla de ácido acético, propiónico y butírico sobre la tasa de producción de hidrógeno utilizando bacterias púrpura no azufradas. El inóculo fotofermentativo usado para la producción de hidrógeno fue seleccionado a partir de 3 fuentes (del ánodo de un sistema bioelectroquímico usado para producir hidrógeno, lodo granular anaerobio proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales y de una laguna del paseo de Los Lagos en Xalapa, Veracruz, México). El consorcio proveniente de un sistema bio-electroquímico fue el que presentó los mejores resultados presentando producción específica de hidrógeno de 12.68 mmol de hidrógeno y una velocidad de producción de 1.21 mmol de hidrógeno/d usando únicamente ácido acético y butírico. El efecto de la mezcla de ácidos fue estudiado en ensayos discontinuos y la optimización utilizando un diseño experimental de superficie de respuesta del tipo Box-Behnken y central compuesto. El contenido de hidrógeno en el biogás presentó purezas de entre 77 y 87%. La aplicación del modelo de optimización permitió obtener las concentraciones óptimas para la productividad de hidrógeno, siendo estas 1200 mg/L de ácido acético, 1571 mg/L de ácido butírico y 715 mg/L de ácido propiónico. Para estos datos la máxima producción específica y velocidad de producción de hidrógeno fue de 10.88 mmol y 0.65 mmol/d respectivamente.

## INTRODUCCIÓN

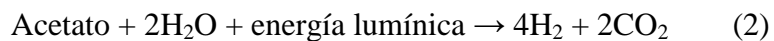
En la actualidad, los combustibles fósiles son considerados la principal fuente de abastecimiento de energía. Pero debido a su creciente demanda y su limitada disponibilidad por ser recursos no renovables, se hace necesaria una fuente alternativa de energía (Das y Veziroglu, 2008).

El hidrógeno se proyecta como una alternativa prometedora frente a los combustibles fósiles ya que su combustión limpia sin emisiones de CO<sub>2</sub> y puede ser convertida eficientemente en electricidad a través de la tecnología de celdas de combustible (Levin et al., 2004). Además, el hidrógeno sólo produce agua, cuando se quema como combustible o convertido en electricidad, lo que hace que sea muy respetuosa del medio ambiente (Hawkes et al., 2002). El hidrógeno tiene una alta densidad de energía de 122 kJ/g, que es 2.72 veces mayor que el de la gasolina (Kapdan y Kargi, 2006). La producción biológica de hidrógeno se considera la ruta más viable y amigable para el medio ambiente. En particular, estos procesos pueden usar una variedad de sustratos orgánicos como fuentes de carbono (Manish y Banerjee, 2008) para que como ya se mencionó se presente un doble beneficio: la reducción de residuos y la producción de energía a partir del hidrógeno (Chen y Chang, 2006). Sin embargo, en un proceso fermentativo en teoría 1 mol de glucosa debería producir 12 mol de H<sub>2</sub> pero debido a limitaciones termodinámicas, solo se producen máximo 4 moles (Chen et al., 2008).

La combinación de procesos fermentativos en fase oscura y lumínica ha sido propuesta como una alternativa para mejorar la productividad de H<sub>2</sub> (Chen et al., 2010). En el caso de un proceso fermentativo en fase oscura, la oxidación de la glucosa conduce a la formación de máximo 4 moles de H<sub>2</sub> y cantidades variables de subproductos como ácidos grasos volátiles, AGVs (Ec. 1).



Mediante el uso de energía luminosa y bacterias purpuras no azufradas resultaría teóricamente factible alcanzar hasta 8 mol de H<sub>2</sub> por mol de glucosa alimentado al proceso mediante la fermentación de los sub-productos generados en la fase oscura (Ec. 2) (Kapdan y Kargi, 2006) (Shi y Yu, 2006).



La fermentación en fase luminosa mediante cultivos puros en suspensión resulta bastante prometedora debido a la pureza del biogás generado ( $\text{H}_2$ : 80%), a las conversiones de sustrato observadas (>65%) y a la factibilidad de alcanzar altos rendimientos mediante el acoplamiento de fases (entre 4.6 y 7.1 mol  $\text{H}_2$ /mol de glucosa). Sin embargo, dicha alternativa presenta en la actualidad desventajas como el escaso aprovechamiento de la energía radiante suministrada (entre el 2-10% del total), una fuerte dependencia del tipo y de la intensidad de la energía y finalmente bajas velocidades de producción de hidrógeno (Hidayet y Fikret, 2011). El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de una mezcla de ácidos acético, propiónico y butírico sobre la tasa de producción de hidrógeno utilizando bacterias púrpura no azufradas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto de las concentraciones de ácidos grasos volátiles sobre la producción de hidrógeno en un proceso fotofermentativo a nivel laboratorio.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Obtener un inóculo productor de hidrógeno que contenga bacterias púrpura no azufradas a partir de tres fuentes: celda bioelectroquímica, lodo granular y sedimento de una laguna.
- Analizar el efecto de la mezcla de ácido grasos volátiles en un la fermentación luminosa mediante ensayos discontinuos utilizando un diseño experimental de superficie de respuesta del tipo Box-Behnken y Central Compuesto
- Obtener una respuesta optimizada usando el programa Minitab 15 que ofrezca las concentraciones óptimas de ácido acético, propiónico y butírico para mejorar la productividad de hidrógeno en un proceso fotofermentativo.
- Construir un fotobiorreactor de panel plano y puesta en marcha del mismo a partir de los datos obtenidos.

## **METAS**

- Se obtendrá un inóculo de consorcio mixto con lo cual se hará el proceso de producción de hidrógeno más robusto.
- Se encontrará la concentración de ácidos grasos volátiles óptima que permitan la mejor condición para la producción de hidrógeno.
- Se darán las bases para el acoplamiento del proceso fermentativo en fase luminosa con la fase oscura y de esta forma obtener una mayor producción de hidrógeno.

## CAPÍTULO I

### GENERALIDADES

De todas las posibles fuentes de energía que pueden sustituir a los combustibles fósiles, el hidrógeno molecular ( $H_2$ ) es considerado “el energético del futuro”, debido a que presenta ventajas sobre otros productos. Entre éstas destaca su mayor contenido energético por unidad de peso entre los combustibles gaseosos conocidos (143 GJ/ton); es altamente eficiente al convertirlo en energía utilizable; es el único libre de carbono que al oxidarse totalmente libera agua como su producto de combustión, por lo que no genera gases de efecto invernadero y, por lo tanto, no contribuye a la formación de lluvias ácidas ni al adelgazamiento de la capa de ozono; es de fácil transporte, muy versátil y seguro en su manejo y uso. Sin embargo, los aspectos tecnológicos de producción necesitan ser reestructurados para poder ser considerado desde el punto de vista ambiental y económico, siendo las biotecnologías las más aptas para resolver estas desventajas.

#### 1.1 PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

El hidrógeno molecular es generado a partir de fuentes de energía primaria, utilizando procesos de producción termoquímicos, electrolíticos, fotolíticos, químicos y biológicos (Ortega-Valencia y François-Lacouture, 2007). A nivel mundial, 40% del energético se produce a partir de gas natural, 30% del petróleo crudo, 18% de carbón, y 4% de la electrólisis del agua (Brentner et al., 2010).

Para que en realidad sea considerado como un combustible con verdaderas ventajas ambientales, debe originarse a partir de fuentes renovables y no generar contaminantes durante su fabricación (Dutta et al., 2005).

##### 1.1.1 Producción de biohidrógeno

La producción de biohidrógeno puede ser llevada a cabo por tres diferentes mecanismos: a) fermentación oscura, b) fotofermentación, y c) biofotólisis. En las primeras dos se utilizan como sustrato residuos orgánicos, y la producción de hidrógeno es realizada por bacterias anaerobias y púrpuras, no del azufre, respectivamente. En la biofotólisis el hidrógeno es



generado por microalgas y cianobacterias, el CO<sub>2</sub> y la radiación luminosa se emplean como fuente de carbono y de energía (ej. luz solar), respectivamente (Brentner, et al., 2010).

**Tabla 1.1.** Mecanismos de producción de biohidrógeno.

Mecanismo	Microorganismos	Sustratos	Productos de fermentación*	Gases producidos	Ventajas	Desventajas
Fermentación oscura	Bacterias anaerobias	Carbohidratos y compuestos orgánicos de fermentación	Ácidos orgánicos y alcoholes	H <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub>	Alta producción de H <sub>2</sub> Uso de residuos orgánicos Uso de consorcios microbianos	Bajo rendimiento de hidrógeno por fermentación incompleta Pretratamiento a la biomasa Presencia de microorganismos metanogénicos
Fotofermentación	Bacterias púrpuras no azufradas	Ácidos grasos Residuos orgánicos Luz como fuente de energía		H <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub>	No hay generación de bioproductos	Alta demanda de enzima nitrogenasa Diseño de reactores para incrementar el uso de luz
Biofotólisis	Microalgas y cianobacterias	CO <sub>2</sub> Luz como fuente de energía		H <sub>2</sub> y O <sub>2</sub>	Uso de luz solar H <sub>2</sub> producido a partir de agua y luz	Sensibilidad al O <sub>2</sub> Baja productividad

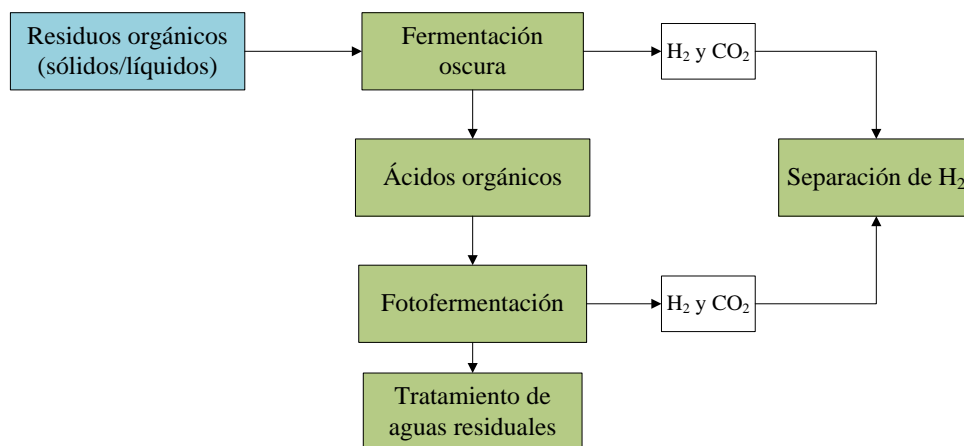
\*Productos de fermentación obtenidos durante la formación de H<sub>2</sub>.

En los tres mecanismos la producción de hidrógeno se lleva a cabo en anaerobiosis

## 1.2 PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO POR MICROORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS (FOTOFERMENTACIÓN)

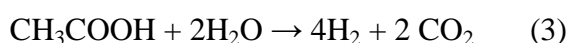
En la producción de biohidrógeno por fermentación oscura se han empleado residuos de frutas y vegetales, aguas residuales domésticas y aguas residuales de la industria alimentaria entre otros. Los ácidos orgánicos generados en la fermentación oscura pueden ser usados como sustrato por las bacterias fotosintéticas para producir hidrógeno, esto en una segunda etapa de fermentación anaerobia fotosintética como se muestra en la figura 1.1 (Shi y Yu, 2006). Este tipo de bacterias tienen la ventaja sobre las algas de no producir O<sub>2</sub> el cual es un fuerte inhibidor de la hidrogenasa.

Las bacterias fotosintéticas no azufradas (FNA), tienen la capacidad de convertir los ácidos grasos volátiles en H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en condiciones anóxicas (Kapdan y Kargi, 2006). Las bacterias fotosintéticas no azufradas también tienen la posibilidad de utilizar fuentes de carbono como la glucosa, sacarosa y succinato entre otros en lugar de ácidos grasos volátiles (AGVs) para la producción de H<sub>2</sub> (Jeong et al., 2008). Las bacterias fotosintéticas no azufradas más conocidas y utilizadas en la foto-fermentación para la producción de H<sub>2</sub> son la *Rhodobacter sphaeroides*



**Figura 1.1.** Esquema de producción de hidrógeno en dos etapas.

O.U001, *Rhodobacter capsulatus*, *R. sphaeroides-RV*, *Rhodobacter sulfidophilus*, *Rhodopseudomonas palustris* y *Rhodospirillum rubrum* (Basak y Das, 2007). Las enzimas hidrogenasa y nitrogenasa se detectaron en las bacterias fotosintéticas no azufradas (Das y Veziroglu, 2001). Sin embargo, la nitrogenasa es la enzima principal responsable de la producción de H<sub>2</sub> molecular bajo condiciones anóxicas (Koku et al., 2002) (Dasgupta et al., 2010). La ecuación (3) presenta la formación de hidrógeno a partir de ácido acético por fotofermentación (Manish y Banerjee, 2008). Debido a un cambio positivo de energía libre, de entrada la reacción no es espontánea ya que requiere energía externa en forma de luz que puede ser proporcionada por una fuente de luz artificial o solar (Argun y Kargi, 2010). Tal como se presenta en la ecuación (3) teóricamente, 4 moles de H<sub>2</sub> pueden ser producidos a partir de un mol de ácido acético (Uyar et al., 2009).



El control estricto de las condiciones ambientales es esencial para una eficiente producción de H<sub>2</sub> mediante foto-fermentación (Argun et al., 2008). El pH óptimo se encuentra entre 6.8 y 7.5 y la temperatura entre 31-36 °C (Basak y Das, 2007). La longitud de onda y la intensidad luminosa adecuadas para la foto-fermentación se reportó de entre 400 y 1000 nm, 6 y 10 klux, respectivamente (Koku et al., 2002) (Akkerman et al., 2002). El hierro y el molibdeno son los cofactores más importantes requeridos por la enzima nitrogenasa en la producción de H<sub>2</sub> (Fascetti et al., 1998). El uso limitado de nitrógeno es de especial importancia ya que hasta 20 μM de amonio según lo reportado causa la inhibición de la enzima nitrogenasa responsable de

la formación de  $H_2$  (Koku et al., 2002). Las concentraciones óptimas de los ácidos grasos volátiles oscilan entre 1800 y 2500 mg/L (Chen et al., 2007). (Akkerman et al., 2002).

### 1.3 BACTERIAS PÚRPURA NO AZUFRADAS

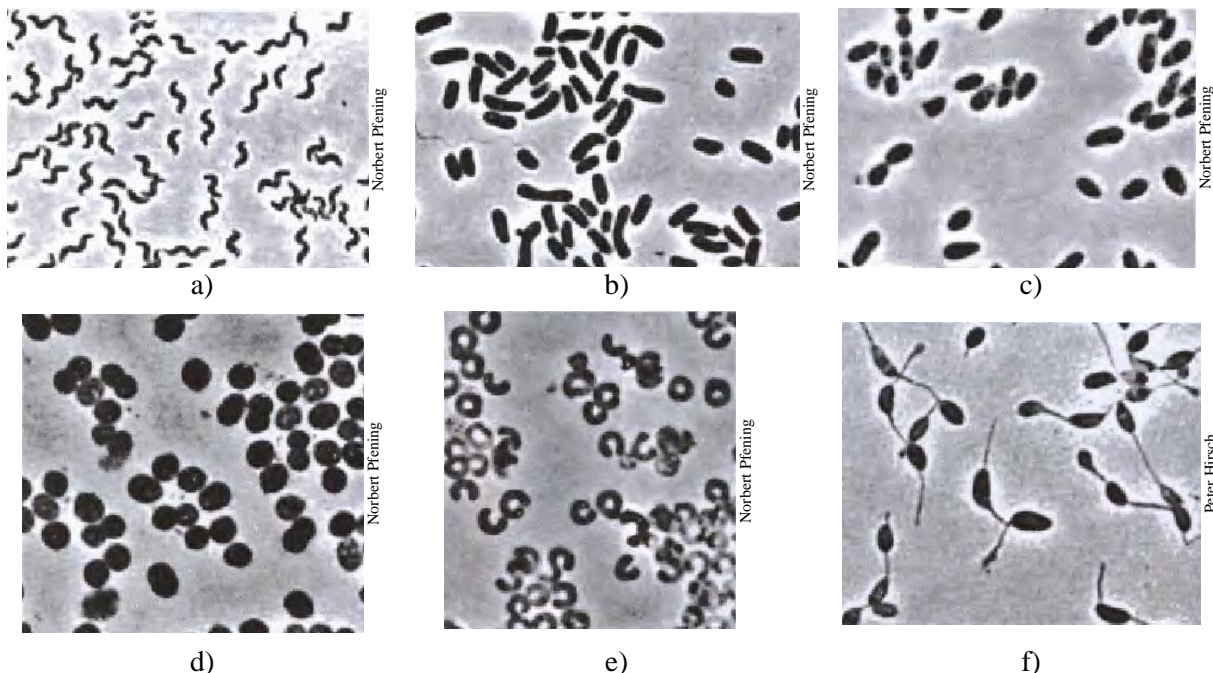
Las bacterias rojas fototróficas llevan a cabo fotosíntesis anoxigénica. Es decir, en contraposición a las cianobacterias no se produce liberación de  $O_2$ . Las bacterias púrpuras son un grupo morfológicamente diverso y la clasificación de estos organismos se ha establecido conforme a criterios filogenéticos, morfológicos y fisiológicos. Sus diferentes géneros caen dentro de los Alfa-, Beta, o Gammaproteobacterias (Madigan M. et al., 2009).

Las bacterias rojas o púrpuras contienen bacterioclorofilas y pigmentos carotenoides. En conjunto, estos pigmentos proporcionan a las bacterias rojas colores espectaculares, habitualmente púrpura, rojo o marrón.

Algunas bacterias se denominan bacterias púrpura no azufradas porque en un principio se pensó que eran incapaces de utilizar sulfuros como fuente de electrones para la reducción de  $CO_2$  para formar material celular. De hecho, la mayoría de las especies en este grupo puede utilizar sulfuro, aunque las concentraciones de sulfuro ideales para las bacterias púrpura del azufre (1-3 mM) son a menudo tóxicas para la mayoría de las bacterias púrpura no azufradas. Son microorganismos que pueden crecer como fotoheterótrofos, como fotoautótrofos o quimioheterótrofos, cambiando de modo dependiendo de condiciones como: grado de anaerobiosis, disponibilidad de fuente de carbón y de fuente de luz. Algunas bacterias púrpura no azufradas pueden crecer anaeróbicamente en la oscuridad utilizando un metabolismo respiratorio fermentativo o anaerobio y la mayoría pueden crecer en la oscuridad utilizando un metabolismo respiratorio aerobio (Madigan M. et al., 2009).

En cualquier caso lo que explica el éxito competitivo de este grupo en la naturaleza es su capacidad para la fotoheterotrofia (en la que la luz es la fuente de energía y un compuesto orgánico actúa como fuente de carbono). Una característica de las bacterias púrpura no azufradas es su diversidad nutricional ya que utilizan como fuente de carbono compuestos orgánicos, grasas o aminoácidos; azúcares; alcoholes; o incluso compuestos aromáticos como el benzoato o el tolueno. La mayoría de las especies pueden también crecer fotoautotróficamente con  $CO_2 + H_2$  o con  $CO_2 +$  bajos niveles de  $H_2S$ .

La diversidad morfológica de las bacterias púrpura es diversa (Figura 1.2) y en este sentido constituyen un grupo claramente heterogéneo. Todas las bacterias púrpura no azufradas aisladas hasta el momento son bien alfa- o bien betaproteobacterias (Madigan M. et al., 2009).



**Figura 1.2** Ejemplos de varios géneros de bacterias púrpura no azufradas. a) *Phaeospirillum fulvum*, b) *Rhodoblastus acidophilus*, c) *Rhodobacter sphaeroides*, d) *Rhodopila globiformis*, e) *Rhodocycclus purpureus*, f) *Rhodomicrobium vannielii* (Madigan M. et al., 2009).

El proceso fotosintético que está a cargo de la bacterioclorofila no produce oxígeno y posee solamente un fotosistema y no emplea H<sub>2</sub>O como donador de electrones. Este proceso es típico de las bacterias fotótrofas o fotosintéticas (bacterias verdes y bacterias púrpuras) que realizan la fotosíntesis en condiciones estrictamente anaerobias (Stolp, 1996).

Las bacterias fotosintéticas no pueden reducir el NAD<sup>+</sup> directamente durante la reacción luminosa. Para sintetizar NADH o NADPH, las bacterias púrpuras y verdes deben usar donadores de electrones tales como el hidrógeno, el sulfuro de hidrógeno o compuestos orgánicos que tienen potenciales de reducción más negativos que el agua y que por tanto, son más fáciles de oxidar (son mejores donadores de electrones), cuando utilizan compuestos en azufre forman gránulos de este elemento que acumulan en el interior de la célula. Las bacterias verdes del azufre depositan los gránulos de azufre fuera de sus células (Dasgupta et al., 2010).

La bacterioclorofila de las bacterias fotosintéticas tiene valores máximos de absorción en longitudes de onda más largas. Debido a que estas bacterias crecen en zonas anaerobias profundas de los hábitats acuáticos, no son capaces de utilizar con eficiencia partes del espectro visible que usan normalmente los organismos fotosintéticos. Los pigmentos de la bacterioclorofila pueden absorber luz en la región del rojo lejano, que no utilizan los otros microorganismos fotosintetizadores (Pares y Juárez, 1997)

Las bacterias púrpura no azufradas productoras de hidrógeno parecen tener un metabolismo muy flexible: pueden utilizar sustratos orgánicos como donadores de hidrógeno para la fotosíntesis, pero algunas de ellas pueden utilizar también compuestos reducidos de azufre. Además, pueden prescindir de la luz y crecer aerobiamente en la oscuridad en función de la materia orgánica presente en el medio (Atlas, 2001).

Las bacterias púrpura no azufradas pueden ser móviles o no, las móviles presentan flagelos polares, estos organismos utilizan la fotosíntesis anoxigénica. El sistema fotosintético está contenido en complejos de membrana de forma circular o vesicular, que se continúa con la membrana plasmática. La célula se divide por fisión binaria, de la cual se producen células en cápsula o en forma de cadena (Madigan et al., 2000).

Las bacterias púrpuras no azufradas son muy flexibles en cuanto a la fuente de energía que utilizan. Normalmente crecen de forma anaerobia como microorganismos fotoorganoheterótrofos; esto es, que captan energía lumínica y utilizan moléculas orgánicas como fuente de electrones y carbono. Aunque reciben el nombre de bacterias no azufradas, algunas especies pueden oxidar niveles muy bajos, no tóxicos de sulfuro a sulfato, crecer de forma aerobia, aunque no oxidan azufre elemental a sulfato. En ausencia de luz, las bacterias púrpuras no azufradas pueden crecer de forma aerobia como quimiorganoheterótrofos (Madigan et al., 2000).

La morfología de las bacterias púrpura no azufradas es muy variable, pueden ser espirales, con forma de bacilo, semicircular o circular e incluso pueden formar yemas. Debido a su metabolismo, este tipo de bacterias predominan más en el lodo y en el agua de lagos y estanques ricos en materia orgánica y con niveles bajos de azufre (Harley y Prescott, 2004).

Los cultivos de bacterias púrpura no azufradas pueden ser de un color café verdoso oscuro, cuando estos crecen bajo condiciones anaerobias al estar presente la luz. Los cultivos que crecen en presencia de luz y aire se tornan de color rojo.

Estos organismos crecen preferentemente de un modo fotoheterótrofo, bajo condiciones anaerobias, con compuestos orgánicos que sirven de fuente de carbón y electrones, como por ejemplo glucosa, fructosa, almidón, celulosa, entre otros. Además presentan un crecimiento fotoautotrófico usando hidrógeno molecular o sulfato como lentos donadores de electrones. También se ha observado crecimiento de estas bacterias en condiciones aerobias en oscuridad empleando compuestos orgánicos como los antes mencionados. De igual manera se ha visto un crecimiento marginal, debido a que pueden llevar a cabo, un metabolismo fermentativo en oscuridad y en anaerobiosis usando piruvato y azúcares.

El crecimiento óptimo de las bacterias púrpura no azufradas se da entre los 30°C y los 35°C. Estas bacterias tienen la habilidad de crecer anaerobiamente en condiciones de oscuridad empleando nitrato como donador de electrones y fuente de nitrógeno, puede fijar el N<sub>2</sub>, sintetizar bacterioclorofila y reducir metales. (Staley y Bryant, 1989).

### **1.3.1. Fotosíntesis en las bacterias púrpuras no azufradas**

Las bacterias púrpuras presentan bacterioclorofila a o b, absorben luz en la banda correspondiente a la bacterioclorofila (400-950 nm), también absorben luz de una segunda región entre los 400 y 500 nm, debido a la presencia de los carotenoides responsables del color rojo, púrpura o marrón de las bacterias fototróficas. Estos pigmentos protegen a las bacterias del efecto tóxico de la fotooxidación y además transfieren la energía absorbida a la bacterioclorofila. Invaginaciones de la membrana proporcionan espacio para la localización del aparato fotosintético (Akkerman et al., 2002).

Un elemento esencial del aparato fotosintético es el centro de captación de la luz (CL), que incluye más del 90% de la bacterioclorofila, conjuntamente con carotenoides y muchas proteínas. Estos centros transfieren la energía luminosa a los centros de reacción. Cada centro de reacción puede estar asociado a muchos CL (entre 20 y 40). El centro de reacción denominado P870, es un complejo que incluye 4 moléculas de bacterioclorofila (dos de ellas activas fotoquímicamente), 2 moléculas de bacteriofeofitina (bacterioclorofila libre de

magnesio) y una proteína con tres subunidades diferentes. Este centro de reacción se encuentra asociado a un complejo de hierro-ubiquinona. Estos dos complejos integrados en la membrana, se encuentran asociados a otro complejo, también anclado en la membrana, denominado citocromo bc1. Al aparato fotosintético pertenece también la ubiquinona y el citocromo c2, moléculas que se mueven libremente en la membrana (Margalith, 1992).

En presencia de luz, cada cuántum absorbido provoca que un electrón se transloque del par de bacterioclorofilas activas del centro de reacción a la bacteriofeofitina, vía una bacterioclorofila secundaria, pasando posteriormente al complejo ubiquinona-hierro. De aquí, el flujo de electrones sigue vía complejo citocromo bc1 y citocromo c2, el cual vuelve a reducir otra vez al complejo P870.

Este transporte de electrones cíclico genera un gradiente de protones en la membrana, estimándose que por cada electrón que circula son expulsados al exterior dos protones que son utilizados para generar ATP mediante la ATP sintetasa. La utilización de la luz por la bacteria fotosintética no azufradas tiene como resultado la generación de ATP y no la de poder reductor. Por ello la necesidad de una fuente de poder reductor usada en  $\text{NAD}^+$  para generar NADH, la fuente de poder reductor puede ser un compuesto inorgánico reducido de azufre o compuestos orgánicos como donadores de electrones (White, 2000).

### **1.3.2 Fotoproducción de hidrógeno**

La habilidad de fijar nitrógeno en las bacterias púrpura no azufradas se debe a la presencia de una enzima llamada nitrogenasa. Además esta enzima está asociada principal o completamente con la producción de hidrógeno, siempre y cuando no esté presente el nitrógeno molecular (Allakhverdiev et al., 2010).

El nitrógeno molecular es el sustrato natural de la nitrogenasa, pero inhibe la producción de hidrógeno por esta enzima. Cuando está presente el  $\text{N}_2$ , la reacción de fijación del nitrógeno predomina y la producción de hidrógeno no se realiza (Cammack y Frey, 2001).

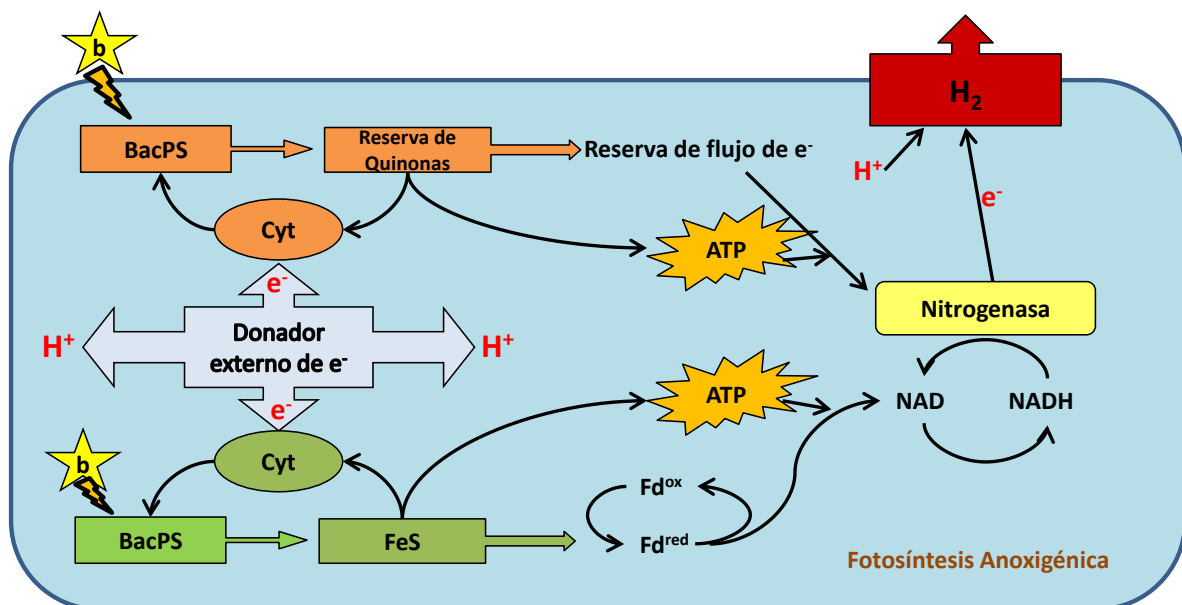
La eficiencia de operación en la nitrogenasa requiere de ATP como poder reductor y de ciertos controles que regulen su actividad. Un represor o inhibidor de la nitrogenasa es el oxígeno, el cual provoca una destrucción irreversible de la enzima.

El amonio es el segundo inhibidor, utilizado frecuentemente como fuente de nitrógeno en los medios de cultivo de bacterias púrpuras no azufradas. Este reprime tanto la síntesis como la actividad de la nitrogenasa. La inhibición puede ser reversible y la enzima recobra su actividad una vez que el amonio sea consumido o removido (Hoekema et al., 2002).

La síntesis de la nitrogenasa es fuertemente estimulada por la luz, resultando en un incremento en la actividad. Se ha observado que el diseño con luz natural (es decir, ciclos alternos de luz – oscuridad), provoca una mayor estabilidad en la actividad de la enzima (Eroglu et al., 1999).

La presencia de la hidrogenasa es una característica común en las bacterias fotosintéticas. Estudios in vitro muestran que la hidrogenasa de este tipo de bacterias son capaces tanto de producir como de consumir H<sub>2</sub>. Sin embargo, la producción de hidrógeno es atribuida principalmente a la nitrogenasa, por lo que la actividad de la hidrogenasa es insignificante en la producción del gas.

La actividad de la hidrogenasa está en función al consumo de hidrógeno, de tal manera que ha sido aceptada generalmente como un antagonista metabólico de la nitrogenasa. Por tal motivo se ha intentado crear organismos mutantes de bacterias fotosintéticas, en los que se elimina la capacidad de sintetizar la enzima, dichos experimentos tienen como objetivo mejorar la producción de hidrógeno (Vignais et al., 1985).



**Figura 1.3.** Proceso de producción de hidrógeno en bacterias púrpura no azufradas adaptada de Dasgupta et al., 2010.



Con respecto al proceso de la producción biológica de hidrógeno (Figura 1.3) se realiza de la siguiente manera; como ya se ha mencionado, las bacterias púrpura no azufradas puede utilizar compuestos orgánicos, que al ser oxidados producen  $\text{CO}_2$  y electrones, estos últimos se incorporan en la cadena transportadora de electrones del fotosistema, el cual convierte la energía luminosa en ATP. Posteriormente el citocromo bc1 transfiere los electrones a la ferredoxina y esta a su vez a la nitrogenasa, la cual utiliza parte del ATP en reducir los protones a hidrógeno molecular. Los protones también pueden ser suministrados en parte por la oxidación de los compuestos orgánicos y otros tantos son proporcionados por la acción de la ATP sintetasa.

En este caso la hidrogenasa funciona principalmente en dirección al consumo del hidrógeno, es decir, produciendo protones ( $\text{H}^+$ ) y electrones. Por tanto, la cantidad neta de producción de hidrógeno es la cantidad producida por la nitrogenasa menos la consumida por la hidrogenasa (Miyake y Miyake, 1999).

La producción de  $\text{H}_2$  mediante las bacterias purpuras no azufradas (BPNS), tiene las ventajas siguientes:

1. Las BPNS pueden ser usadas en el tratamiento del agua residual ya que son capaces de usar una gran variedad de compuestos orgánicos simples para producir  $\text{H}_2$ , incluyendo ácido acético.
2. Se ha encontrado rendimientos de producción de  $\text{H}_2$  mayores que aquellas con fermentación oscura, usando la misma cantidad de sustrato.
3. La concentración de  $\text{H}_2$  en el biogás producido mediante fotofermentación es 75-90% lo que simplifica la purificación del biogás.

### **1.3.3 Aislamiento y enriquecimiento de bacterias púrpura no azufradas**

El aislamiento y enriquecimiento de bacterias púrpuras no azufradas es sencillo utilizando un medio con sales minerales suplementado con un ácido orgánico como fuente de carbono. Un medio de este tipo, inoculado con lodo, agua lacustre o una muestra de aguas residuales e incubadas en ausencia de oxígeno en presencia de luz selecciona invariablemente bacterias púrpura no azufradas (Madigan M. et al., 2009).

Los cultivos de enriquecimiento pueden hacerse aún más selectivos eliminando del medio fuentes de nitrógeno fijado (como por ejemplo  $(\text{NH}_4^+)$  o fuentes orgánicas de nitrógeno (como por ejemplo extracto de levadura o peptona) y proporcionando una atmósfera de argón para seleccionar el metabolismo productor de  $\text{H}_2$  y serán capaces de crecer en estas condiciones, por regla general superando a otras bacterias.

#### 1.4 CRECIMIENTO BACTERIANO

En un sistema cerrado o con medio no renovado, también llamado cultivo monofásico o discontinuo, el crecimiento exponencial de una población no puede continuar indefinidamente y se obtiene una típica curva de crecimiento como la que se indica en la Figura 1.5. Esta curva de crecimiento describe un ciclo completo de crecimiento y puede dividirse en distintas fases llamadas fase lag, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (Madigan M. et al., 2009).

##### *Fase lag o de latencia*

Cuando se inocula una población microbiana en un medio fresco, por lo general el crecimiento no comienza inmediatamente sino sólo tras un período de tiempo que constituye la fase lag o fase de latencia, la cual puede ser breve o prolongada dependiendo de la historia del cultivo y de las condiciones de crecimiento. Si un cultivo exponencial se inocula en el mismo medio y bajo las mismas condiciones de crecimiento, no se observa retraso y el crecimiento exponencial se inicia inmediatamente. Sin embargo, si el inóculo se toma de un cultivo viejo (fase estacionaria) y se inocula en el mismo medio, se observa normalmente un retraso incluso aunque todas las células del inóculo sean viables, es decir, sean capaces de reproducirse. Esto se debe con frecuencia a que las células carecen de varios componentes esenciales para dividirse y se requiere tiempo para su resíntesis. También se aprecia retraso cuando las células del inóculo han sido dañadas parcialmente con calor, radiaciones o compuestos tóxicos, debido al tiempo requerido para recuperarse y reparar los daños (Madigan M. et al., 2009).

La fase de latencia también ocurre cuando se transfiere una población de un medio rico a otro medio más pobre, por ejemplo de un medio complejo a un medio definido. Para que ocurra crecimiento en un medio de cultivo particular, las células deben tener un equipamiento enzimático completo que permita la síntesis de los metabolitos esenciales que no están

presentes en el medio. Al pasar a otro medio, se necesita tiempo para la síntesis de las nuevas enzimas (Madigan M. et al., 2009).

### *Fase exponencial*

La fase exponencial de crecimiento, es consecuencia de que cada célula se divide para formar dos, cada una de las cuales va a formar otras dos, y así sucesivamente durante un período de tiempo que puede ser breve o prolongado en función de los recursos disponibles y de otros factores. En general, las células en crecimiento exponencial están en el estado fisiológico más sano y por ello las células tomadas en crecimiento exponencial son a menudo las más indicadas para estudios enzimáticos y estructurales.

La mayoría de los microorganismos unicelulares crecen exponencialmente pero las velocidades del crecimiento exponencial son muy variables. La velocidad de crecimiento está influenciada por las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio de cultivo) así como por las características genéticas del organismo. Por lo general, los microorganismos procariotas crecen más rápido que los eucariotas y los eucariotas pequeños lo hacen más deprisa que los mayores. Cuanto más pequeñas son las células, presentan mejor capacidad relativa de intercambio de nutrientes y de producción de desecho en comparación con las células más grandes, y esta ventaja metabólica afecta notablemente a su crecimiento y a otras propiedades (Madigan M. et al., 2009).

### *Fase estacionaria*

En un sistema de cultivo cerrado, monofásico o discontinuo el crecimiento exponencial no se puede prolongar de modo indefinido.

Para limitar el crecimiento de la población lo que generalmente sucede es que (1) un nutriente esencial del medio de cultivo se agota y llega a ser un factor limitante del crecimiento o (2) se acumulan en el medio algunos productos de desecho hasta niveles inhibidores que hacen cesar el crecimiento exponencial. Frecuentemente ocurren ambas cosas y, al producirse esto, la población alcanza la fase estacionaria.

En la fase estacionaria no hay aumento ni descenso neto en el número de células. Aunque no suele haber crecimiento en la fase estacionaria, muchas funciones celulares continúan,

incluyendo el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos. En algunos casos, puede ocurrir un lento crecimiento durante la fase estacionaria; algunas células de la población crecen, pero otras mueren y los dos procesos se equilibran de modo que no hay aumento ni disminución en el número de células (Madigan M. et al., 2009).

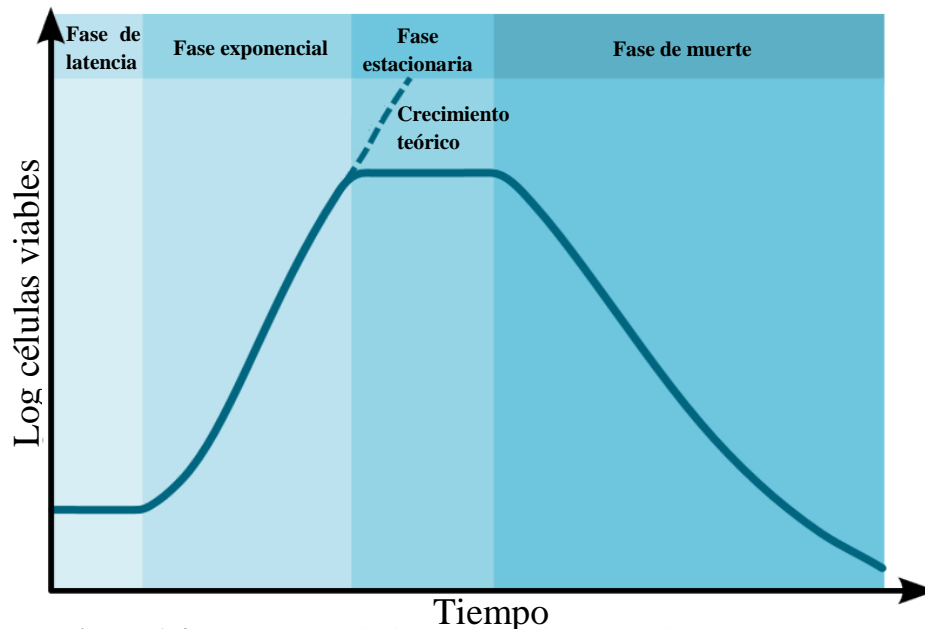


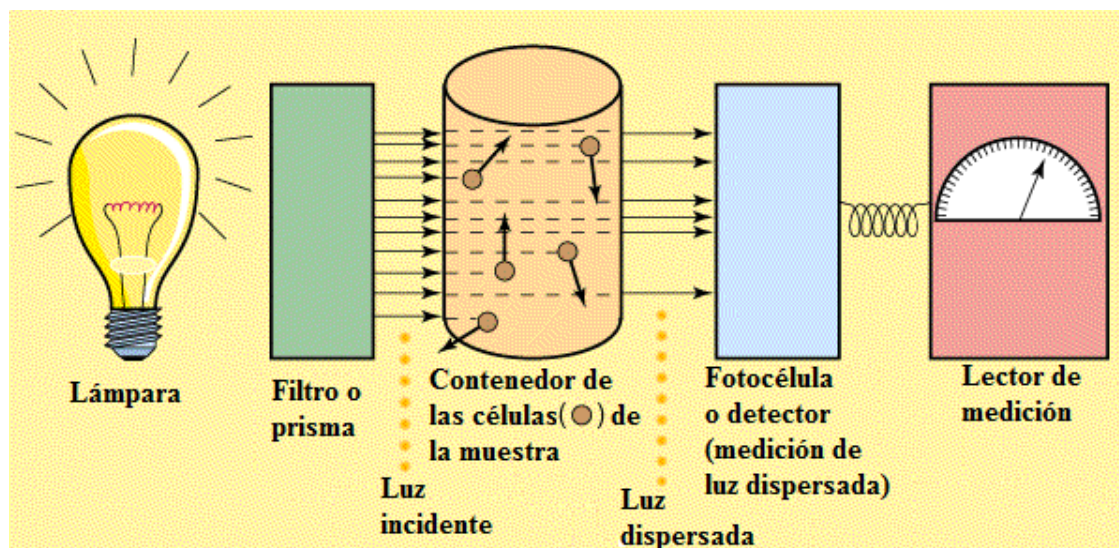
Figura 1.4 Fases del crecimiento microbiano (Madigan M. et al., 2009).

### 1.4.1 Medida de la masa microbiana: Densidad óptica

La turbidez puede medirse con un espectrofotómetro, un instrumento que hace pasar la luz a través de suspensiones celulares y detecta la cantidad de luz emergente no dispersada. El espectrofotómetro emplea un prisma o red de difracción para generar luz incidente de longitud de onda específica. Las longitudes de onda más comúnmente usadas para medir la turbidez bacteriana son 480 nm (azul), 540 nm (verde), 600 nm (naranja) y 660 nm (rojo).

La sensibilidad es mayor a longitudes de onda cortas, pero las medidas con suspensiones celulares densas son más exactas a mayores longitudes de onda. Sin embargo, a cualquier longitud de onda lo que se mide es el descenso de luz no dispersada causado por la turbidez. En un espectrofotómetro las lecturas se expresan en unidades de densidad óptica (OD) a una longitud de onda determinada; por ejemplo  $OD_{540}$  indica la medida de la densidad óptica a 540 nm.

Esta técnica es la empleada en la cuantificación de biomasa para las bacterias púrpura no azufradas.



**Figura 1.5.** Las medidas de turbidez se realizan en un espectrofotómetro. La fotocélula mide la luz incidente no dispersada por las células en suspensión y da lecturas de densidad óptica o unidades fotométricas (Madigan M. et al., 2009).

## 1.5 MODELO DE GOMPERTZ

Es posible ajustar matemáticamente la producción de hidrógeno por fermentación luminosa mediante la ecuación modificada de Gompertz (ecuación 6), la cual es un modelo adaptado para describir el progreso acumulativo de producción de  $H_2$  en un experimento discontinuo.

Para el análisis de la evolución de la producción acumulada de hidrógeno se utilizó un modelo matemático

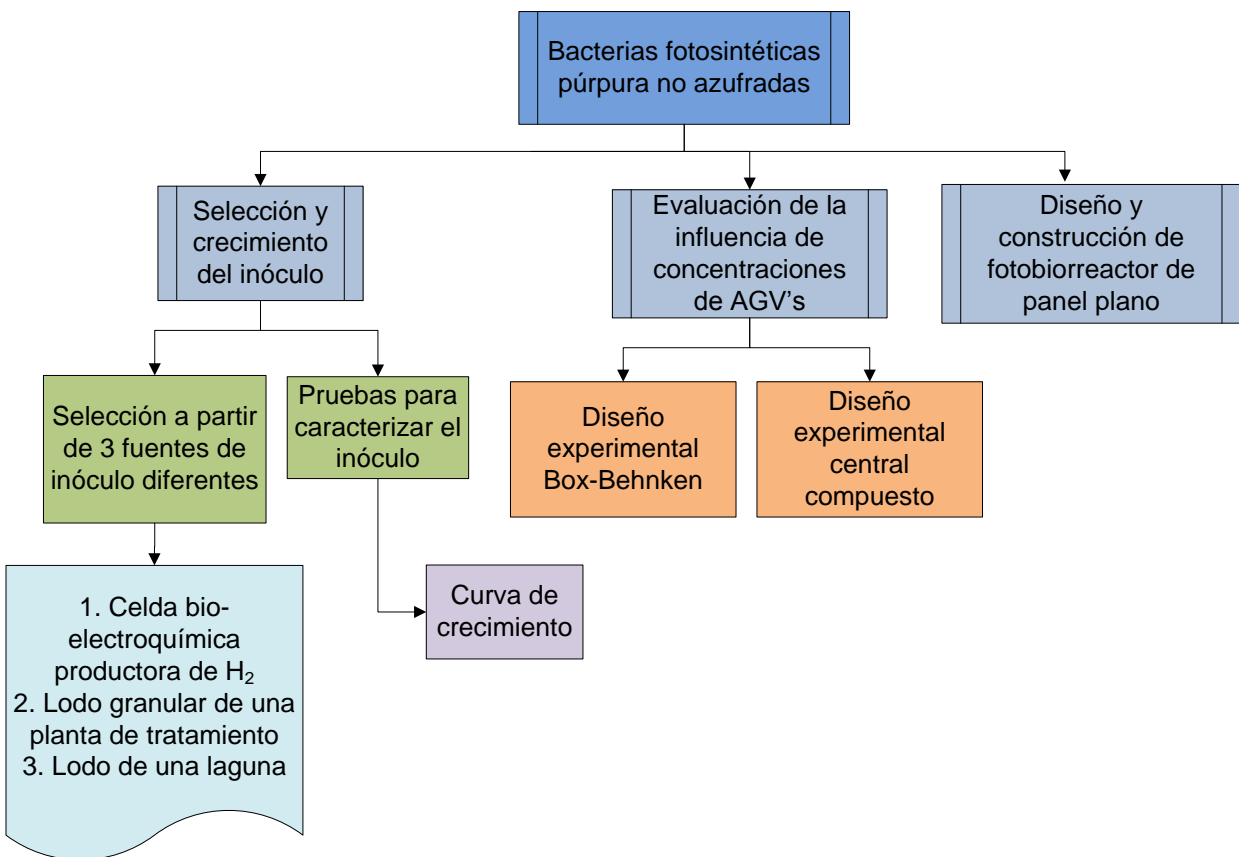
$$H = H_{max} \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{R_{max} \times e}{H_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (6)$$

donde  $H$  corresponde a la producción acumulada de  $H_2$  (ml),  $H_{max}$  a la producción acumulada máxima de  $H_2$  en (mL),  $R_{max}$  la tasa de producción máxima de  $H_2$  en (mL/h),  $t$  el tiempo del cultivo en (h) y  $\lambda$  el tiempo de retardo en (h) requerido para comenzar la evolución del  $H_2$ . Esta ecuación ha sido empleada por diferentes autores (Buitrón y Carvajal, 2010) con muy buenos ajustes  $r^2 > 0.90$ , donde se ha querido correlacionar resultados experimentales con un modelo matemático de tipo predictivo.

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología en esta investigación se enfocó, primeramente, en seleccionar un inóculo de consorcio mixto que contuviera bacterias púrpura no azufradas a partir de 3 diferentes fuentes, el cual presentó las mejores características para la producción de hidrógeno. A partir del mejor inóculo se realizaron pruebas para encontrar las concentraciones óptimas de AGVs a partir de un diseño experimental el cual se basa en las cantidades que son obtenidas de efluentes de reactores de fermentación oscura. A su vez se trabajó de manera preliminar un fotobiorreactor que permitió realizar algunas observaciones en cuanto a la operación del mismo. La Figura 2.1 muestra esquemáticamente las pruebas a realizar.



**Figura 2.1.** Diagrama metodológico y experimental empleado para el cultivo de la bacteria púrpura no azufrada y la producción de hidrógeno a partir de la misma.

## 2.1 MATERIALES

Se implementó un sistema de iluminación utilizando rieles con spots para colocar focos de tungsteno (60 W) y lámparas incandescentes (100 W). Para la medición de la intensidad luminosa se usará un medidor digital de luz Extech LT300. Para medir la presión se usó un transductor de presión electrónico modelo PS100 (2 Bar).

## 2.2 MEDIOS DE CRECIMIENTO

El medio basal utilizado (Ying Li et al., 2008) estuvo compuesto por 0.75 g/L  $K_2HPO_4$ , 0.85 g/L  $KH_2PO_4$ , 0.2 g/L  $MgSO_4$ , 11.78 mg/L  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2.8 mg/L  $H_3BO_3$ , 0.75 mg/L  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.24 mg/L  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2.1 mg/L  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , 0.04 mg/L  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.75 mg/L  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 2.0 mg/L EDTA-Na, 3.78 mg/L Vitamina B1 y 3.57 mg/L de Biotina. Este medio mineral fue el único utilizado durante la etapa experimental y usado tanto para el medio de crecimiento como para el medio de producción de hidrógeno.

### 2.2.1 Medio de crecimiento

Para el medio crecimiento se utilizó acetato de sodio y butirato de sodio como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno glutamato de sodio, se empleó una relación C/N de 80 (Ru et al., 2008) para esta etapa y siempre con una proporción del doble de carbono de butirato con respecto al acetato. Los crecimientos se llevaron a cabo de dos formas una con acetato (7.56g/L de acetato de sodio) y otra acetato-butirato (2.46 g/L de acetato de sodio - 3.30 g/L de butirato de sodio) y 0.37 g/L glutamato de sodio. El pH se ajustó a 6.8.

### 2.2.2 Medio de producción de hidrógeno

El medio de producción de hidrógeno utilizó una relación C/N de 16 (Zampol Lazaro et al., 2012), las concentraciones estándar para las pruebas de selección de inóculo fue con 1.0254 g/L de acetato de sodio y 1.3764 g/L de butirato de sodio como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno se usó 0.74 g/L glutamato de sodio. Se ajustó pH a 6.8. Todas las pruebas se llevaron a cabo en botellas serológicas de 160 mL y ocupando un volumen útil de 100 mL.

Para evaluar la producción de hidrógeno a partir de diferentes concentraciones de AGVs las concentraciones guía fueron las obtenidas de los efluentes de los reactores productores de hidrógeno en fermentación oscura.

## 2.3. INÓCULOS

Para obtener las bacterias púrpura no azufradas se prepararon medios de crecimiento de composición acetato y acetato-butirato, posteriormente se colocaron 150 mL de medio de crecimiento con acetato en frascos de 250 mL, de igual forma se colocaron 150 mL de medio acetato-butirato en frascos de 250 mL. A cada frasco se le colocó muestra de cada uno de los 3 inóculos (celda bio-electroquímica productora de H<sub>2</sub>, lodo granular y lodo de una laguna del paseo de Los Lagos en la ciudad de Xalapa, Veracruz). Cada frasco fue gaseado con argón durante 30 s (Srikanth et al., 2009), para tener un ambiente microaerobio y libre de nitrógeno gaseoso antes del cierre con tapón de goma. Posteriormente se colocaron en un área con iluminación de 5000 lux de intensidad luminosa aproximadamente, sin agitación.

Siempre que se cosechaba la biomasa, ésta se centrifugaba a 3500 rpm durante 20 min y posteriormente se resuspendía en el medio basal.

### 2.3.1 Selección de inóculo

Para la selección del mejor inóculo, después de haber obtenido biomasa de la actividad anterior se realizaron pruebas por duplicado para las 3 fuentes de inóculo midiendo la producción de hidrógeno en botellas serológicas de 160 mL. Se usaron dos estrategias de crecimiento variando la fuente de carbono una usando únicamente acetato y otra con una mezcla de acetato-butirato, a cada botella se les dio un volumen útil de 100 mL.



**Figura 2.2.** Selección de inóculo productor de hidrógeno a partir de 3 diferentes fuentes de origen.



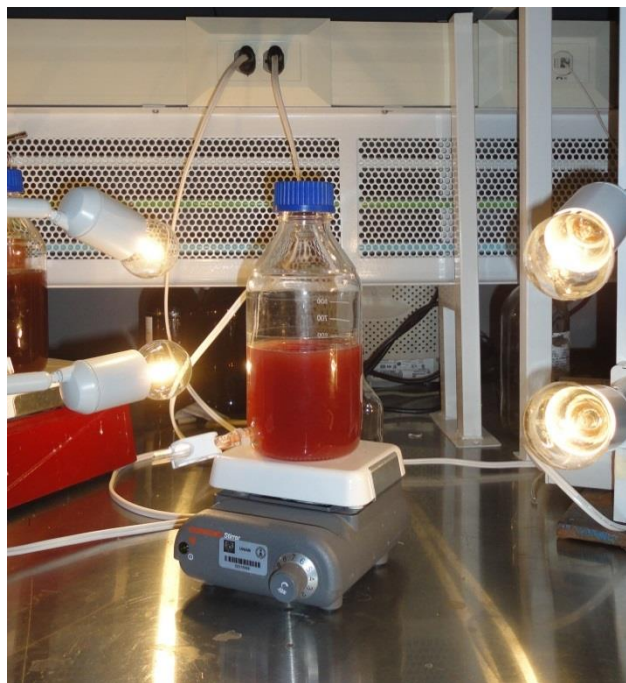
La prueba se inició con 50 mg/L de biomasa y fueron gaseadas con argón por 20 s para tener un microambiente aerobio. Las 18 botellas se colocaron en el área acondicionada para que recibieran una intensidad luminosa de 5000 lux y se mantuvieron a una temperatura promedio de 32 °C.

### 2.3.2 Curva de SST vs absorbancia

Con el objetivo de facilitar la lectura de sólidos suspendidos totales se realizó una curva de calibración de SST vs absorbancia. Para realizarla se prepararon por duplicado 7 diferentes diluciones con la biomasa que ofreció los mejores resultados en cuanto a la producción de hidrógeno posteriormente se realizó el análisis de los SST por métodos gravimétricos y se realizaron las lecturas correspondientes en un espectrofotómetro Lamda 25 UV/VIS (Perkin Elmer) a una longitud de onda de 660 nm como lo reporta Basak y Das (2009), Zampol Lazaro et al. (2012) y Han et al. (2012).

A partir de los datos obtenidos se obtuvo la curva de calibración utilizando el programa Excel.

### 2.3.3 Curva de crecimiento



**Figura 2.3.** Estrategia experimental de curva de crecimiento del inóculo de bacterias púrpura no azufradas.

Para llevar a cabo esta curva (Figura 2.3) se colocó en un frasco de 1 L, 900 mL de medio de crecimiento acetato-butirato y se inició la prueba con una concentración de biomasa productora de hidrógeno de 15 mg/L, se colocó en el área con iluminación para recibir una intensidad luminosa de 5000 lux, y se mantuvo a una temperatura promedio de 32 °C con una agitación de 100 rpm. Cada hora se tomaba una muestra para leerla en el espectrofotómetro UV-Vis a 660 nm de longitud de onda y de esa forma ir siguiendo la curva de crecimiento.

### **2.3.4 Tinción y observación en el microscopio**

La tinción de Gram se realizó fijando en una placa de vidrio una gota de biomasa suspendida posteriormente se agregó suficiente cristal violeta para que se cubriera el extendido bacteriano. Se dejó actuar durante 60 segundos y posteriormente se añadió el lugol, de igual forma se dejó actuar durante 60 segundos y se enjuagó con agua corriente. Posteriormente se agregó una o dos gotas de alcohol-acetona e inmediatamente se volvió a enjuagar con agua corriente. Por último se agregó safranina, y se dejó actuar durante 60 segundos. Se enjuagó con agua corriente y se dejó secar a temperatura ambiente. Después de secarse las muestras fueron observadas en un microscopio óptico con un objetivo 100X usando aceite de inmersión.

## **2.4 DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **2.4.1 Box-Behnken**

Cuando se selecciona un diseño de superficie de respuesta, algunas de las características de un diseño deseable son las siguientes: 1) Provea una razonable distribución de puntos de datos a través de la región de interés, 2) permita la adecuación del modelo, incluyendo la falta de ajuste, para ser investigado, 3) permita que los experimentos sean realizados en bloque, 4) permita construir de forma secuenciada diseños de alto orden, 5) provean un error interno estimado, 6) provea estimación precisa de los coeficientes de los modelos, 7) provea un buen perfil de la predicción de la varianza a través de la región experimental, 8) no requiera un gran número de corridas, 9) no requiera muchos niveles de las variables independientes (Montgomery, 2005). En la selección de la mejor concentración de ácidos grasos volátiles para la producción de hidrógeno se realizó un diseño experimental del tipo Box-Behnken. Este diseño es una alternativa para ajustar modelos cuadráticos que requieren tres niveles de cada factor e igualmente resulta muy eficiente en términos del número de corridas requeridas y

cualquiera de ellos es rotatable o cercanamente rotatable. También, este diseño no contiene puntos en los vértices de la región cúbica creada por el límite más alto y más bajo para cada variable. Esto puede ser ventajoso cuando los puntos en las esquinas del cubo representan combinaciones de factores-nivel que son costosos o requieren condiciones físicas complejas, pues se encuentran lejos del centro, que es regularmente la zona estándar de trabajo (Montgomery, 2005).

**Tabla 2.1.** Valores empleados en diseño experimental Box Behnken.

Variable	Código	Rango y nivel de las variables		
		-1	0	1
Concentración ácido acético (mg/L)	X <sub>1</sub>	125	1235	2345
Concentración ácido butírico (mg/L)	X <sub>2</sub>	50	160	270
Concentración ácido propiónico (mg/L)	X <sub>3</sub>	175	672.5	1170

**Tabla 2.2.** Corridas arrojadas por el diseño Box-Behnken usando el Minitab 15.

Corrida	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Valores en mg/L		
				X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	0	0	0	1235	160	672.5
2	0	0	0	1235	160	672.5
3	-1	1	0	125	270	672.5
4	-1	0	-1	125	160	175
5	0	1	1	1235	270	1170
6	-1	0	1	125	160	1170
7	0	0	0	1235	160	672.5
8	0	1	-1	1235	270	175
9	0	-1	-1	1235	50	175
10	0	-1	1	1235	50	1170
11	1	0	-1	2345	160	175
12	1	0	1	2345	160	1170
13	1	1	0	2345	270	672.5
14	1	-1	0	2345	50	672.5
15	-1	-1	0	125	50	672.5

El arreglo experimental fue obtenido utilizando el programa Minitab 15. En la Tabla 2.1 se pueden observar las variables utilizadas en este caso los tres ácidos grasos volátiles (ácido

acético, ácido butírico y ácido propiónico) así como los rangos y niveles de cada variable que son tres concentraciones (alta, media y baja) diferentes para cada uno de los ácidos. Las concentraciones propuestas se realizaron con base en datos obtenidos de algunos efluentes de fermentación oscura (Buitrón y Carvajal, 2010).

El diseño arrojó 15 pruebas (Tabla 2.2) las cuales se iniciaron al mismo tiempo. A todas las pruebas se les ajustó la relación C/N para que fuera 16. Se inició con una concentración de biomasa de 300 mg/L (biomasa fresca con 168 h de crecimiento) y se gasearon las 15 botellas con argón por 20 s para desplazar el aire y tener un ambiente anaerobio. Todos los días se realizaron mediciones de presión a todas las botellas serológicas y así mismo cada segundo o tercer día se pasaba muestra en el cromatógrafo para conocer la composición del biogás producido.

Así mismo el análisis de los resultados se realizó utilizando el mismo programa, usando el optimizador de respuesta para obtener las mejores concentraciones de ácidos grasos volátiles.

En la figura 2.4 se puede observar el arreglo experimental que se usó durante el diseño experimental Box-Behnken, las 15 botellas fueron colocadas sobre la plancha agitadora a 100 rpm. Se operó a una temperatura de 30-35 °C y una intensidad luminosa de 5000 lux aproximadamente.



**Figura 2.4.** Estrategia experimental usada en el desarrollo del diseño Box-Behnken.

### 2.4.2 Central compuesto

Debido a que el primer diseño experimental sólo presentó un valor optimizado referente al ácido propiónico, se trabajó con un segundo diseño experimental del tipo central compuesto, para obtener las concentraciones ideales de ácido acético y butírico, este fue obtenido auxiliándonos en programa Minitab 15. Se usó el diseño central compuesto ya que es de los diseños más utilizados cuando se busca un modelo de segundo orden que se ajuste a los datos, esto por su gran flexibilidad. En este caso consideramos un factorial completo  $2^2$  como la base del diseño central compuesto con dos factores para conservar la rotabilidad, el valor de  $\alpha$  dependerá del número de corridas experimentales en la porción factorial del diseño central compuesto:  $\alpha = (2^k)^{1/4} = (2^2)^{1/4} = 1.414$ ,  $\alpha$  es la distancia entre los puntos axiales y centrales este valor provee la división en bloques ortogonales y, cuando sea posible, la rotabilidad (Myers y Montgomery, 2002).

Las nuevas concentraciones de ácido acético y butírico (Tabla 2.3) se propusieron con base en los datos de Nan-Qi, et al., (2008). Se continuaron usando los 3 ácidos pero la concentración del ácido propiónico se mantuvo fija en 715 mg/L para las 13 pruebas que resultaron de este diseño (Tabla 2.4) de las cuales 5 corresponden al punto central para el análisis del error.

**Tabla 2.3.** Valores empleados en diseño experimental Central Compuesto.

Variable	Código	Variables codificadas y naturales del diseño				
		-1.414	-1	0	1	1.414
Concentración ácido acético (mg/L)	X <sub>1</sub>	85.8	500	1500	2500	2914.2
Concentración ácido butírico (mg/L)	X <sub>2</sub>	85.8	500	1500	2500	2914.2

De igual manera que en el diseño anterior todas las pruebas fueron ajustadas a la relación C/N de 16. Se agregó una concentración de biomasa inicial de 100 mg/L (biomasa de 168 h de crecimiento) y las 13 botellas se gasearon con argón por 20 s para favorecer un microambiente aerobio. Se trabajó a una temperatura de 30-35 °C, a una intensidad luminosa de 5000 lux aproximadamente y una agitación de 100 rpm (Figura 2.5). Se siguió la curva de producción de hidrógeno mediante mediciones de presión y análisis en el cromatógrafo para conocer la composición del biogás producido en cada uno de las pruebas.

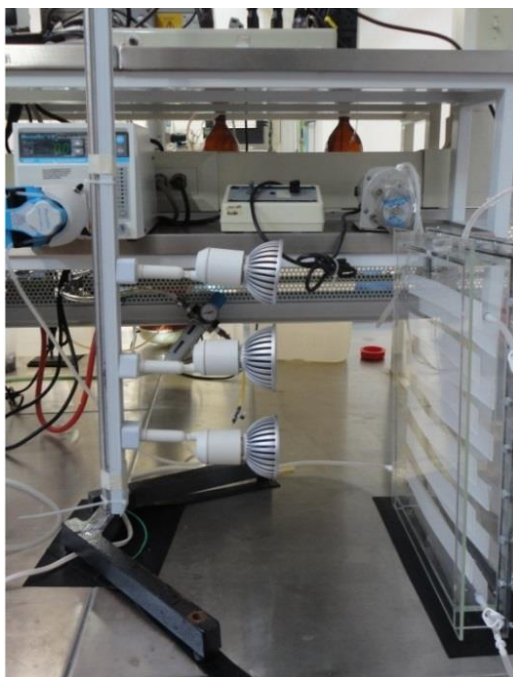
**Tabla 2.4.** Corridas arrojadas por el diseño central compuesto usando el Minitab 15.

Corrida	$X_1$	$X_2$	Valores en mg/L	
			$X_1$	$X_2$
1	0	-1.414	1500	85.79
2	1	-1	2500	500
3	0	0	1500	1500
4	-1	1	500	2500
5	0	1.414	1500	2914.21
6	-1.414	0	85.79	1500
7	1	1	2500	2500
8	0	0	1500	1500
9	0	0	1500	1500
10	0	0	1500	1500
11	-1	-1	500	500
12	1.414	0	2914.21	1500
13	0	0	1500	1500

El análisis de los resultados se realizó utilizando el programa Minitab 15, y se usó el optimizador de respuesta para obtener las mejores concentraciones de ácidos grasos volátiles.

**Figura 2.5.** Estrategia experimental usada en el desarrollo del diseño central compuesto.

## 2.5 Pruebas preliminares en reactor de panel plano



**Figura 2.6.** Montaje de fotobiorreactor.

El fotobiorreactor de escala laboratorio utilizado en las pruebas es del tipo panel plano, el cual totalmente de acrílico con costillas del mismo material biseladas en su interior, para permitir la formación de biopelícula sobre las mismas. La geometría es rectangular con 30 cm de largo, 5 cm de ancho y 40 cm de alto. Su capacidad total es de 6.2 L, de los que 6 L corresponden al volumen útil. Posee una superficie de  $0.3 \text{ m}^2$ , lo que ofrece una relación A/V de  $47 \text{ m}^2/\text{m}^3$ .

Funcionó a temperatura aproximada de  $32^\circ\text{C}$  y con una retroalimentación que proporciona agitación, el volumen de biogás producido fue medido mediante el desplazamiento de agua dentro de una probeta de vidrio.

## 2.6 PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

### 2.6.1 Determinación de la concentración de biogás

La muestra de biogás fue tomada con una jeringa succionando y desplazando el gas por lo menos dos veces para homogenizar la atmósfera. Una vez homogenizado se tomaron 10 mL de muestra e inmediatamente se inyectaran al cromatógrafo de gases.

Se utilizó un cromatógrafo de gases (SRI 8610C) provisto con un detector de conductividad térmica (TCD) y una columna de sílica gel de 1.82m en serie con una columna de tamiz

molecular 13x de 1.82m y un diámetro de 3.175 mm que trabajó a 40°C durante 4 minutos y después se calentó a 110°C con un incremento de 20°C/min. El gas portador utilizado fue nitrógeno con un flujo de 20mL/min. La temperatura del inyector fue de 90°C y del detector de 150°C. Los datos de área obtenidos fueron cotejados con la curva patrón realizada para cada gas y así poder determinar la composición del biogás.

### **2.6.2 Determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles**

Para el análisis se tomó un mL de muestra previamente centrifugada durante 20 min a 3500 rpm. Para la determinación cuantitativa de los AGVs y solventes se utilizará un cromatógrafo de gases (Agilen Tech 6890N, VARIAN 330 C) equipado con un detector de ionización de flama FID y una columna capilar de sílice Zebram ZB-FFPA de 0.53 (mm) de diámetro, 15 m de largo y 1 µm de espesor de película, con las siguientes condiciones de operación: temperatura inicial de horno en 55°C, se mantiene 3 min aumentando a 135 °C a una tasa de 45°C/min, temperatura del inyector, 190°C; temperatura del detector, 210°C; el gas portador fue, nitrógeno.

### **2.6.3. Nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>)**

El análisis por la prueba de Nessler se realizó con el método descrito por en el manual HACH (Método 8038). Se toman 25 mL de muestra a la que se le adicionan tres gotas de estabilizador mineral, tres gotas de solución de un agente dispersante (alcohol polivinílico), se agita y posteriormente se le agrega un mililitro del reactivo de Nessler, se agita y se deja reaccionar un minuto. Una vez transcurrida la reacción, se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 425 nm, se usa un blanco de agua destilada al cual también le fueron agregados los reactivos anteriormente mencionados.

La segunda forma en la que se midió en nitrógeno amoniacal fue con el método descrito por el manual HACH. Se seleccionan dos viales, uno de ellos será preparado como blanco y el otro la muestra a evaluar. Agregar 0.1 mL de muestra a un vial y 0.1 mL de agua desionizada al segundo vial (agua libre de amonio). Posteriormente, a cada vial se debe añadir el contenido de una almohadilla (presentación polvo) de reactivo salicilato para la muestra de 5 mL a cada vial. Además se debe adicionar un segundo reactivo (almohadilla presentación polvo) de cianurato para la muestra de 5 mL a cada vial. Después de esto, cerrar los viales



herméticamente hasta disolver el polvo agregado anteriormente. Un color verde se desarrolla si se detecta la presencia de amonio. Se requiere un periodo de 20 min para que la reacción se lleve a cabo. Una vez transcurrida la reacción se puede leer al espectrofotómetro la longitud de onda. El resultado obtenido se expresa en mg/L de N y NH<sub>3</sub> (HACH, 2000).

#### **2.6.4. Demanda química de oxígeno (DQO)**

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

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

#### **2.6.5. Sólidos suspendidos totales**

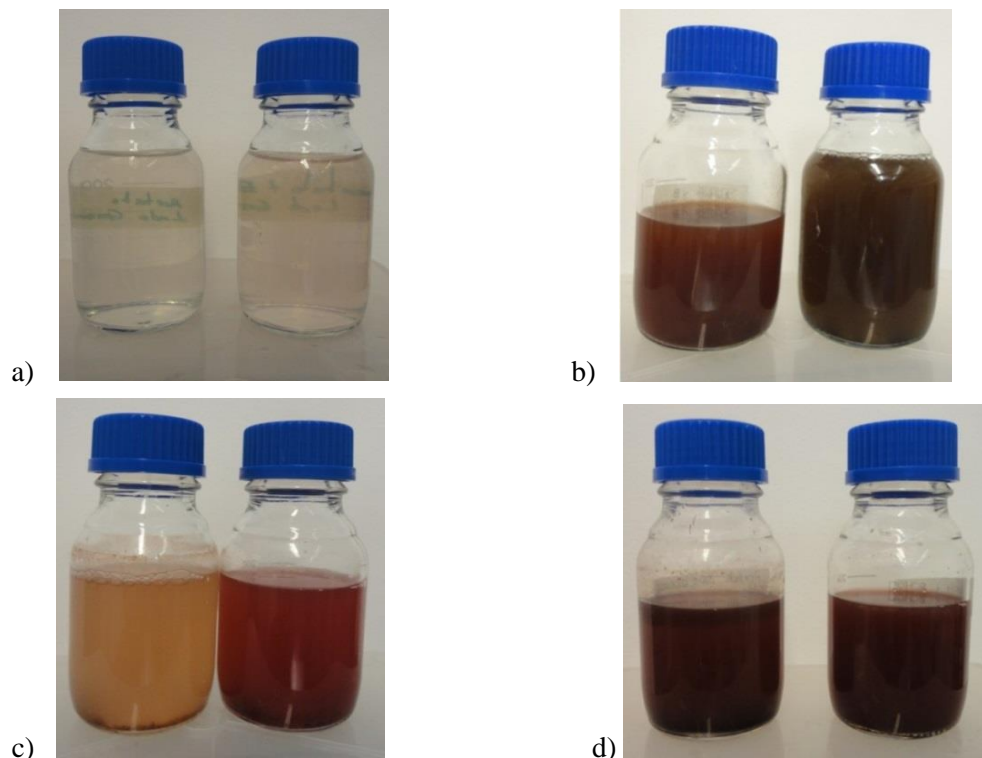
Para la determinación de los sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos se preparó el filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/A), enjugándolo con agua destilada y aplicando vacío en el embudo de filtración, hasta eliminar totalmente el agua en exceso. Se dejó secar en estufa a 103-105°C por 1 hora, se dejó enfriar en el desecador por 15 min y luego se pesó en la balanza analítica. Una vez que se obtuvo el peso constante del filtro, se colocó en el embudo de filtración y se mojó el filtro con una pequeña cantidad de agua destilada. Se tomó un volumen de 5 mL de la muestra homogeneizada, vertiendo el volumen en el embudo de filtración y se aplicó vacío hasta eliminar totalmente el exceso de agua. Usando un soporte de aluminio se llevó a secar a la estufa a 105°C por 1 hora, se dejó enfriar en el desecador durante 15 min y se registró su peso, obteniendo así los datos para el cálculo de los sólidos suspendidos totales.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 SELECCIÓN DE INÓCULO

Las tres fuentes usadas para obtener los inóculos que presentaron bacterias púrpura no azufradas fueron: 1) del ánodo de un sistema bioelectroquímico (SBE) usado para producir hidrógeno (Ruíz López, 2013), 2) lodo granular anaerobio proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales (UASB) y 3) de una laguna del paseo de Los Lagos en Xalapa, Veracruz, México (FN). Las pruebas se iniciaron con un crecimiento de las tres fuentes, a las 72 horas de iniciado el crecimiento se observó la formación de biomasa roja, guinda y marrón. Se obtuvieron consorcios que contenían bacterias púrpura no azufradas, ya que el microambiente aerobio inducido con argón, la alimentación de ácidos grasos volátiles y la iluminación fomentaron su crecimiento. A los 7 días se obtuvo suficiente biomasa para realizar otra inoculación y llevar a cabo un crecimiento específico con los consorcios de microorganismos fotosintéticos productores de hidrógeno obtenido de cada una de las fuentes.



**Figura 3.1.** Primera fase del crecimiento, la botella de la izquierda contiene acetato y la de la derecha acetato y butirato como fuente de carbono. a) Soluciones de crecimiento, b) SBE c) FN y d) UASB.

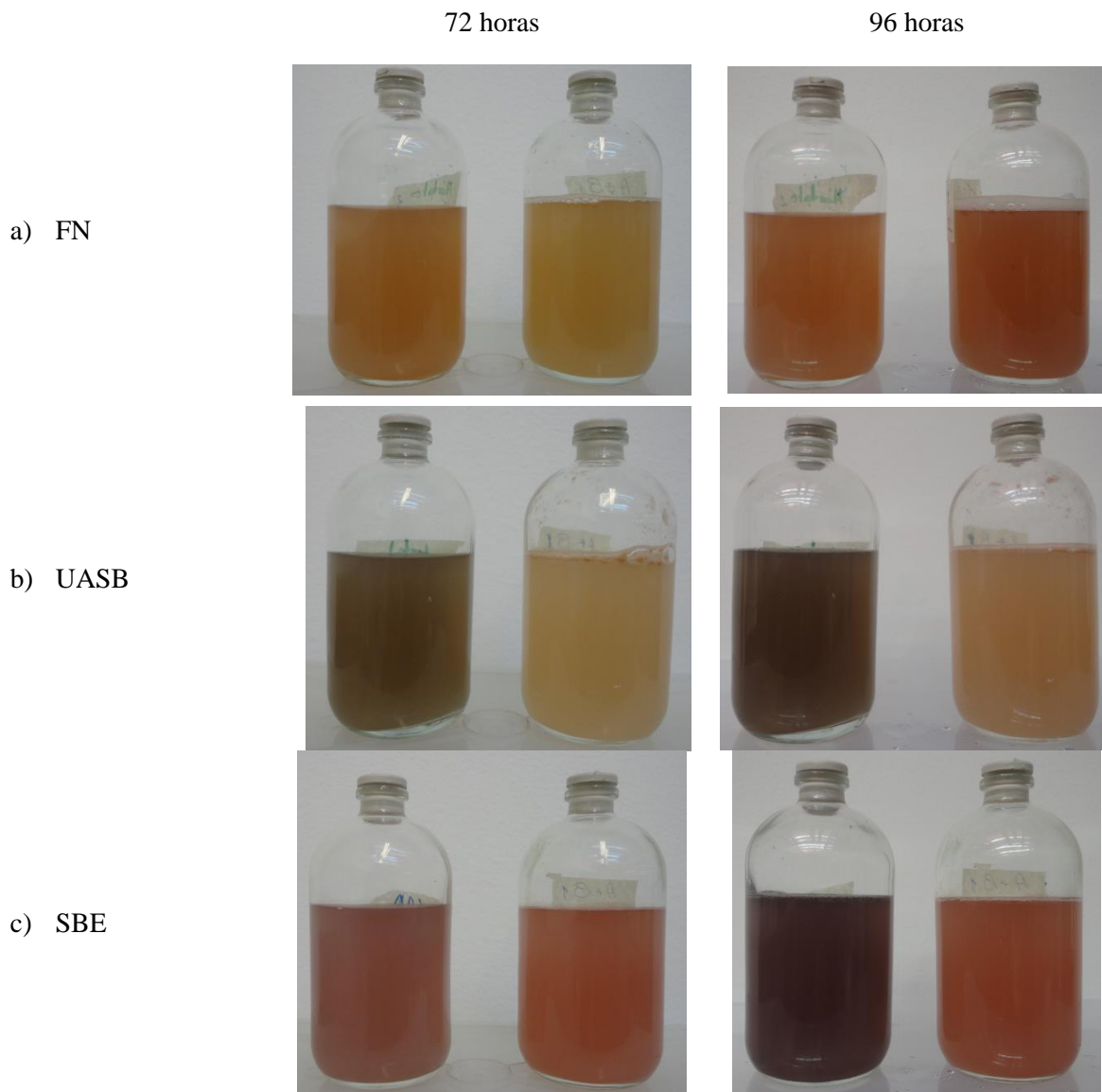
En la figura 3.1 se pueden observar las coloraciones de los consorcios obtenidos a través de las tres fuentes y las dos diferentes estrategias de crecimiento variando la fuente de carbono (acetato y acetato-butirato). La siguiente etapa consistió en evaluar la producción de hidrógeno de las mismas fuentes de inóculo y estrategias de crecimiento, estas pruebas se realizaron por duplicado.



**Figura 3.2.** Montaje experimental para la selección del consorcio fotosintético productor de hidrógeno.

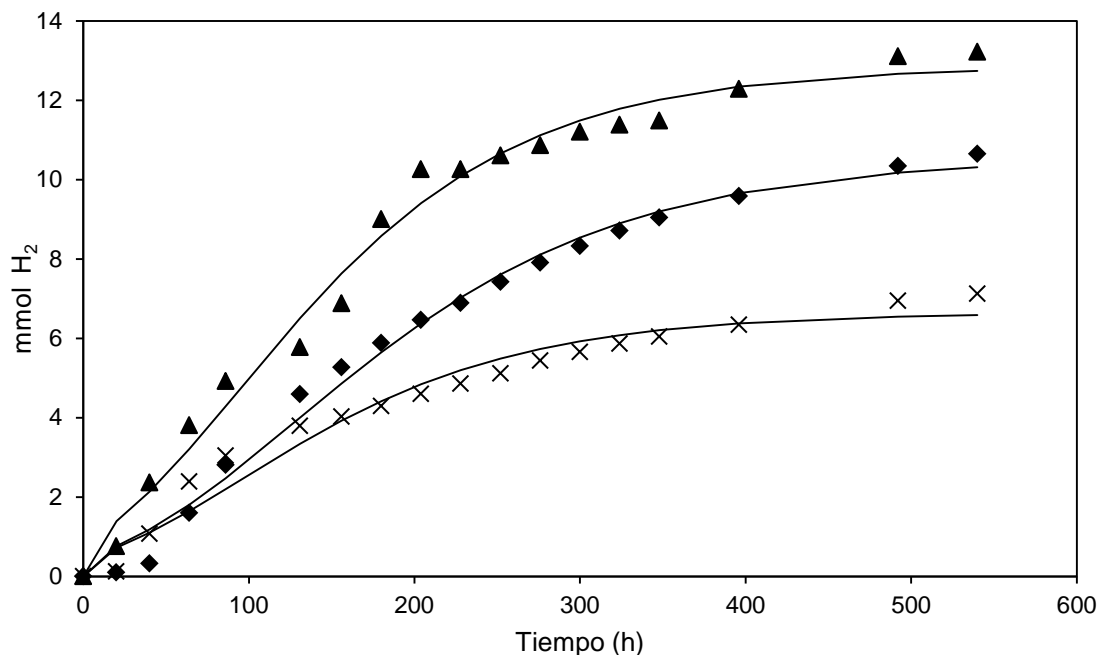
En la figura 3.2 se observa el montaje de la actividad experimental para evaluar a los tres consorcios que contenían mayoritariamente bacterias púrpura no azufradas productoras de hidrógeno. En el arreglo experimental la distancia de la bombilla a cada una de las botellas permitió que cada botella serológica de 160 mL recibiera una intensidad luminosa de aproximadamente 5000 lux y la temperatura se mantuvo entre los 30 y 35 °C. Durante esta etapa no se usó agitación en las botellas. Se pudo observar que las coloraciones variaron durante el crecimiento de la biomasa como se muestra en la Figura 3.3. Las coloraciones se atribuyen a los compuestos llamados bacterioclorofilas y pigmentos carotenoides que producen los consorcios microbianos de bacterias púrpura no azufradas y que confieren a los medios colores: púrpura, rojo, guinda y marrón. Estas coloraciones coinciden con lo reportado por diversas fuentes bibliográficas (Lindquist, 2011; Microbiology Laboratories, 2012;

Madigan M. et al., 2009). La intensidad de las coloraciones fueron aumentando conforme se observaba una mayor cantidad de biomasa en las botellas.

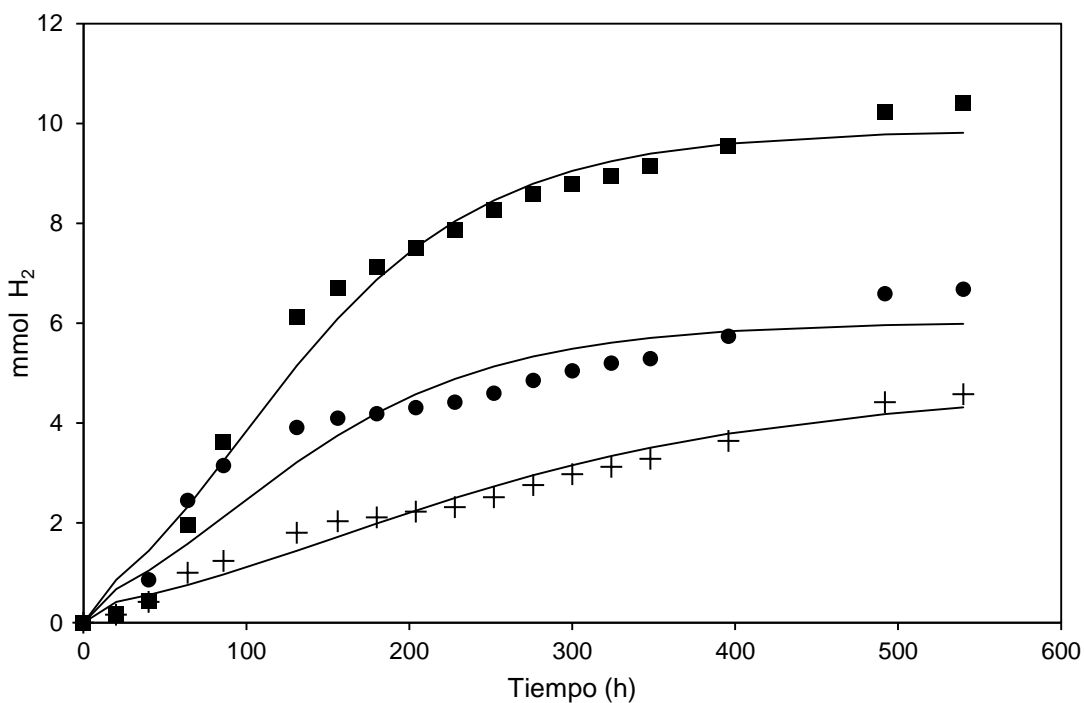


**Figura 3.3.** Coloraciones presentadas por las 3 fuentes de inóculo con las 2 estrategias de crecimiento (izquierda: acetato, derecha: acetato-butirato) a tiempos de 72 y 96 h de iniciado el crecimiento.

Para la evaluación de producción de hidrógeno de las fuentes de inóculo se realizó la prueba por duplicado y se midió la presión de las botellas serológicas diariamente y cada tercer día se realizaron pruebas de composición de biogás. Los resultados obtenidos a partir de las mediciones anteriores para la curva de producción de hidrógeno fueron ajustados de acuerdo al modelo de Gompertz tal y como se puede observar en las figuras 3.4 y 3.5.



**Figura 3.4.** Curvas de producción de hidrógeno ajustadas a Gompertz usando únicamente como fuente de carbono acetato para las 3 fuentes de inóculo: SBE (▲), FN (◆) y UASB (×).



**Figura 3.5.** Curvas de producción de hidrógeno ajustadas a Gompertz usando como fuente de carbono una mezcla acetato-butirato para las 3 fuentes de inóculo: SBE (■), FN (●) y UASB (+).

En la Tabla 3.1 se presentan los valores de las tasas específicas de producción de hidrógeno ( $H_{\max}$ ), la velocidad de producción de hidrógeno ( $R_{\max}$ ), el periodo de latencia y la pureza promedio de hidrógeno.

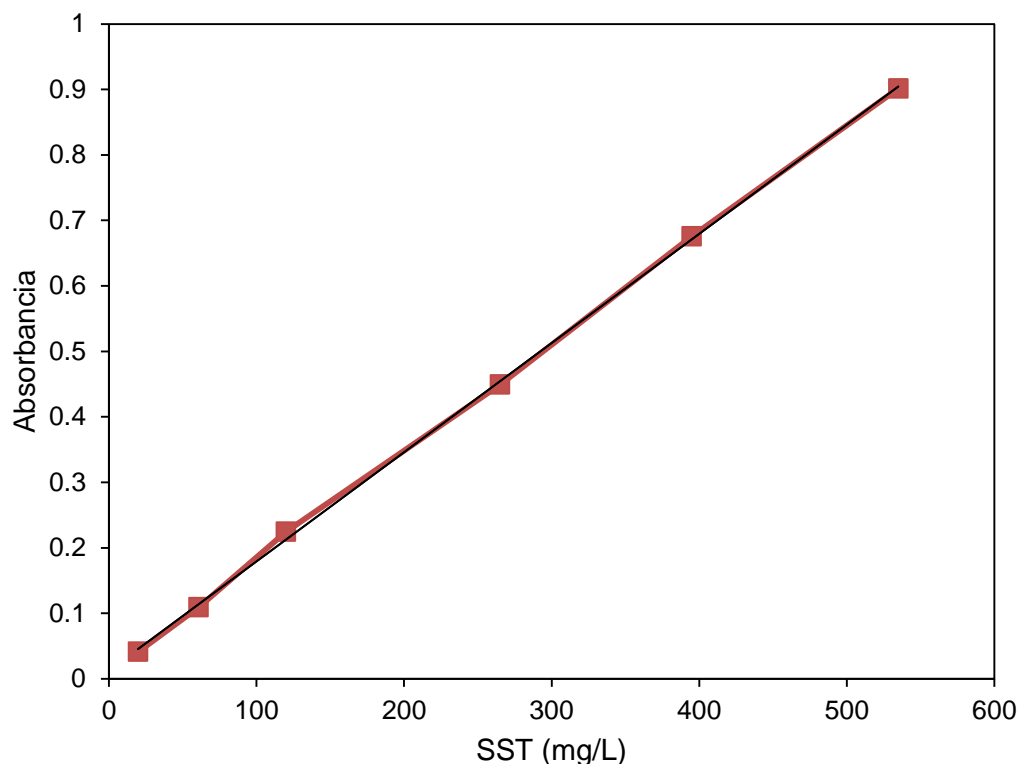
**Tabla 3.1.** Producciones y velocidades obtenidas con los 3 diferentes inóculos.

Inóculo	$H_{\max}$ (mmol)	$R_{\max}$ (mmol/d)	Fase lag (h)	Purezas promedio (% $H_2$ )
FN A	6.03	0.60	1	81
UASB A	4.69	0.27	2	79
SBE A	9.87	1.04	11	81
FN AB	10.58	0.84	16	81
UASB AB	6.65	0.62	1	80
SBE AB	12.86	1.21	1	79

En la Tabla 3.1 se observa que las mejores producciones específicas de hidrógeno se presentaron en el inóculo proveniente de la celda bioelectroquímica, presentando 12.86 mmol de  $H_2$  para el caso en el que es sustrato fue la mezcla acetato-butirato, en el que se usó solamente acetato como fuente de carbono la producción fue de 9.87 mmol de  $H_2$ . El inóculo que también presentó una buena producción con sustrato acetato-butirato y acetato fue el proveniente de la laguna con 10.58 y 6.03 mmol de  $H_2$  respectivamente y en último lugar se encontró el inóculo proveniente del lodo granular presentando rendimientos bajos en comparación con los dos anteriores, de 4.69 y 6.65 mmol de  $H_2$  para el acetato y mezcla acetato-butirato respectivamente. Se presentan de igual forma las velocidades de producción de hidrógeno. Para el sustrato cuya fuente de carbono fue el acetato, las velocidades fueron de 0.27 mmol  $H_2$ /d para el lodo granular, 0.60 mmol  $H_2$ /d para la laguna y 1.04 mmol  $H_2$ /d; en el caso en que el sustrato fue la mezcla de acetato-butirato los resultados fueron de 0.62 mmol  $H_2$ /d para el lodo granular, 0.84 mmol  $H_2$ /d para la laguna y 1.21 mmol  $H_2$ /d. A partir de las pruebas anteriores se decidió trabajar únicamente con el inóculo obtenido a partir de la celda bioelectroquímica ya que presentó los mejores resultados en cuanto a la producción específica y velocidad de producción de hidrógeno. Posiblemente este inóculo brindó mejores resultados dado que la biomasa estaba previamente aclimatada para la producción de hidrógeno.

### 3.1.1 Curva de calibración para sólidos suspendidos totales

A partir del inóculo proveniente de la celda bioelectroquímica productora de hidrógeno, se realizó la curva de calibración de sólidos suspendidos totales (SST) por el método de densidad óptica a una absorbancia de 660 nm. En la figura 3.6 se presentan los datos obtenidos



**Figura 3.6.** Curva de calibración de sólidos suspendidos totales contra absorbancia a una longitud de onda de 660 nm.

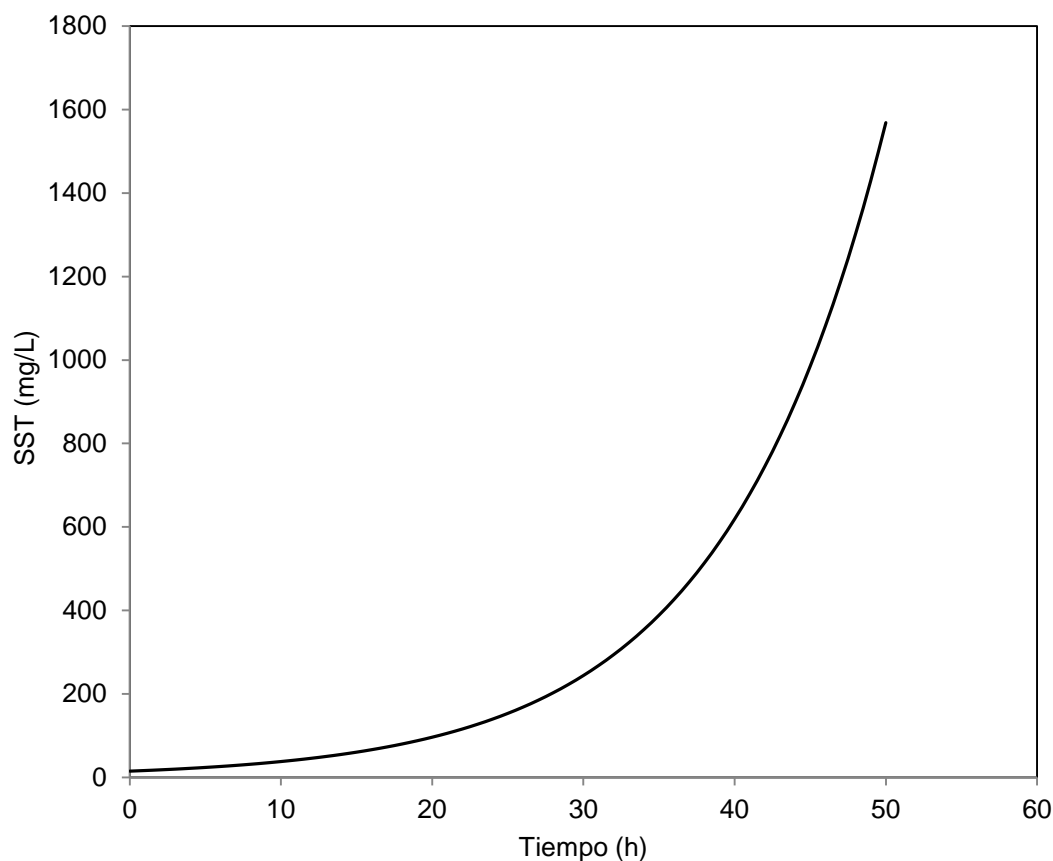
La ecuación de regresión lineal resultante presentó una  $R^2$  de 0.9996. La ecuación (7) para cuantificar los sólidos suspendidos totales en mg/L fue:

$$SST = \frac{ABS - 0.0124}{0.0017} \quad (7)$$

### 3.1.2 Curva de crecimiento

La curva de crecimiento se inició con una concentración de 15 mg/L, se presentó una fase de latencia de aproximadamente 50 horas como se puede observar en la Figura 3.7. La biomasa aumentó a 50 mg/L, pero posteriormente a este tiempo de latencia se registró la fase de crecimiento exponencial estabilizándose a las 150 horas, alcanzando una concentración de

1500 mg/L. La tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) calculada para el consorcio compuesto mayoritariamente por bacterias púrpura no azufradas fue de  $0.093 \text{ h}^{-1}$  y presentó un tiempo de duplicación de 7.45 h estos datos son parecidos ( $\mu=0.09 \text{ h}^{-1}$  y tiempo de duplicación de 7.7 h) a los reportados por Wang et al., 1993 para *Rhodobacter sphaeroides* que se encuentra en el grupo de bacterias púrpura no azufradas.



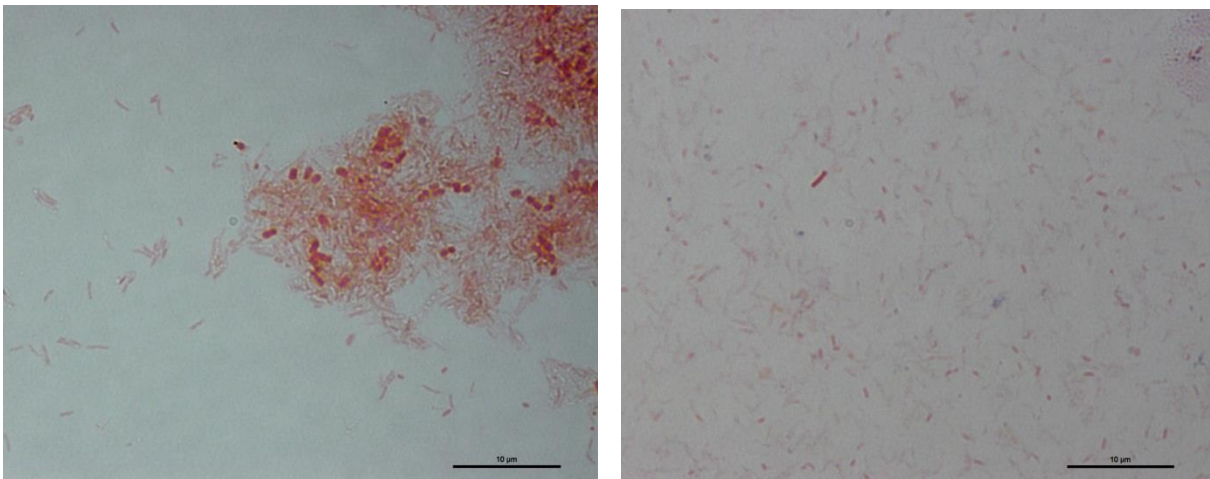
**Figura 3.7.** Curva de crecimiento exponencial del consorcio enriquecido con bacterias púrpura no azufradas.

Durante el crecimiento de la biomasa se observaron variaciones considerables en el pH del medio. El pH inicial de la prueba fue de 6.8 y alcanzó valores superiores a 9.0 por lo que la producción de hidrógeno se inhibió y fue necesario ajustar con una solución 1 N de HCl y posteriormente se gaseó nuevamente con argón para evitar cualquier alteración de la comunidad microbiana por presencia de aire.



### 3.1.3 Características de la comunidad microbiana

Al realizar la tinción de Gram sobre el extendido bacteriano obtenido del inóculo de la celda bioelectroquímica se observó una coloración rosa lo que indicó que se trataba de bacterias Gram negativas, característica que poseen los microorganismos que pertenecen al grupo de bacterias púrpura no azufradas como lo reportan Van Niel (1944) e Imhoff et al., (1984). En la figura 3.8 se observan fotografías tomadas del microscopio a partir de la tinción de Gram tanto de la etapa de crecimiento (izquierda) como la de producción de hidrógeno (derecha). Se observaron dos diferentes biomasas como consecuencia de las distintas relaciones C/N utilizadas. Durante la fase de crecimiento se usó una relación C/N de 80 (2.46 g/L de acetato de sodio-3.30 g/L de butirato de sodio y 0.37 g/L glutamato de sodio), por lo cual las bacterias produjeron una gran cantidad de biomasa exopolimérica floculante. En contraste, durante la etapa de producción de hidrógeno se observó un crecimiento disperso. Se observó que el tamaño de los microorganismos osciló de 0.5-3  $\mu\text{m}$  aproximadamente.



**Figura 3.8.** Microfotografías con tinción de Gram. A la izquierda alta relación C/N y a la derecha baja relación C/N.

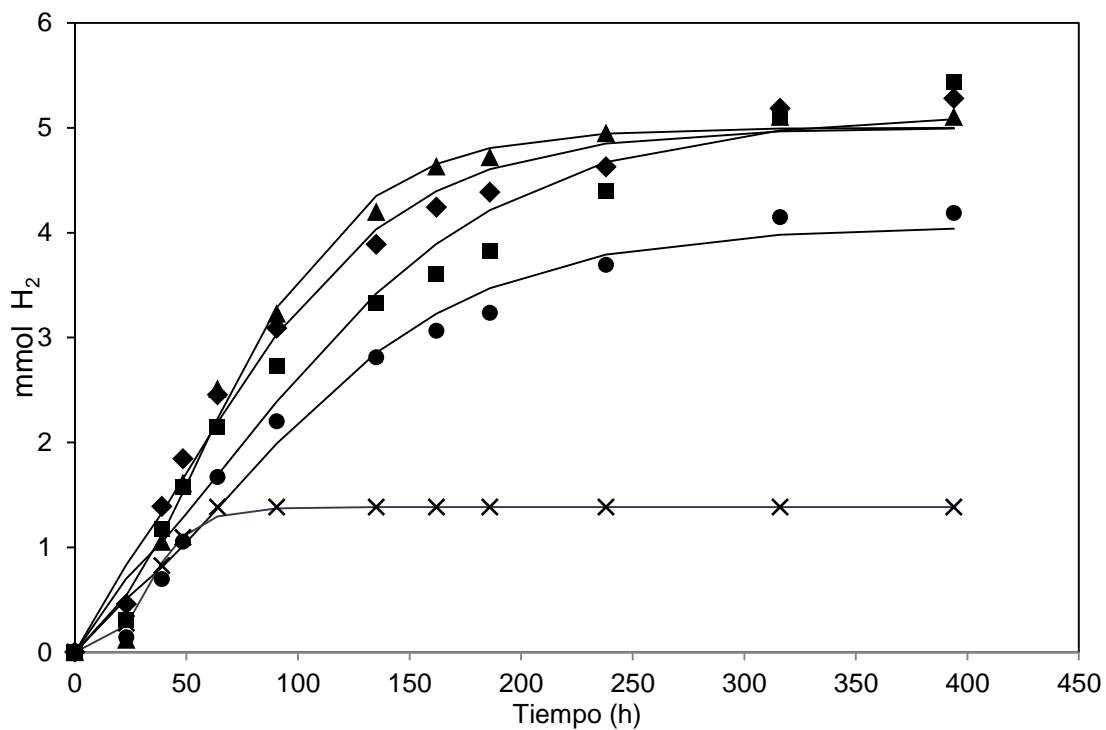
## 3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

### 3.2.1 Box-Behnken

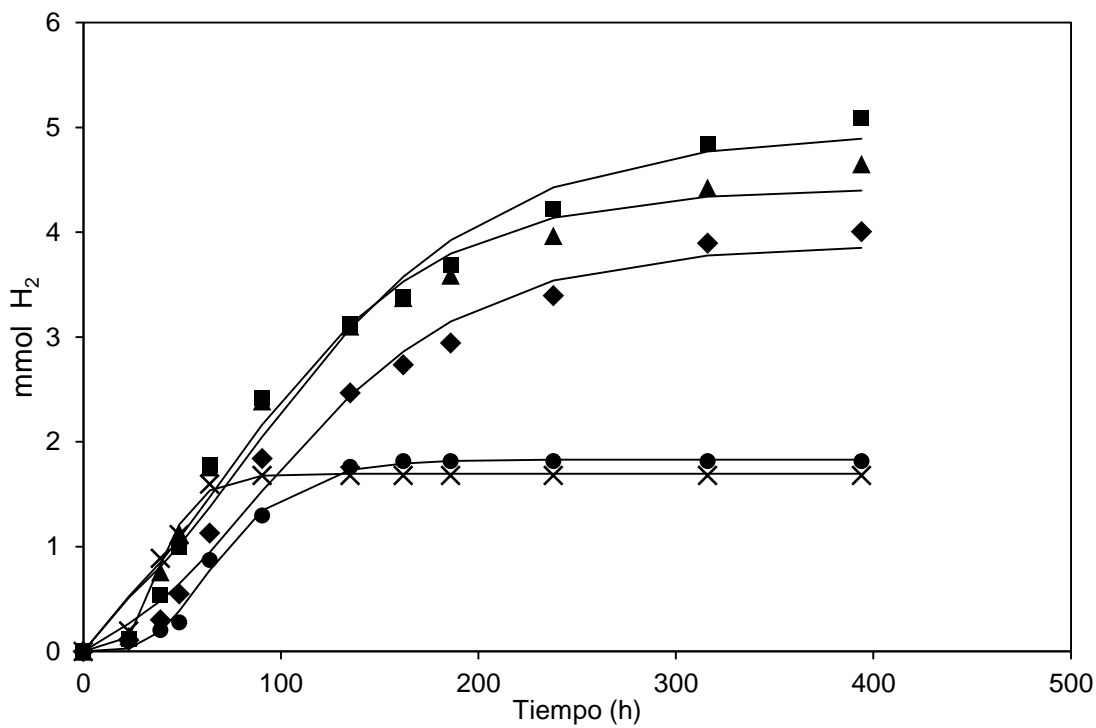
La primera etapa experimental para determinar la influencia de las concentraciones de ácidos grasos volátiles se realizó usando el diseño experimental del tipo Box-Behnken, este diseño arrojó 15 pruebas, las cuales se realizaron en un mismo lote a una temperatura de 30-35 °C, 100 rpm y 5000 lux de iluminación aproximadamente. Los valores codificados de las variables de la prueba y los resultados experimentales (modelo de Gompertz) de la producción específica de hidrógeno, de la velocidad máxima de producción de H<sub>2</sub> y el tiempo de latencia se presentan en la Tabla 3.2. De igual forma en las Figuras 3.9, 3.10 y 3.11 se muestran las curvas de producción de hidrógeno ajustadas al modelo de Gompertz para las 15 pruebas. Todo el análisis de datos se realizó mediante el software Minitab15.

**Tabla 3.2.** Diseño experimental Box-Behnken con los valores de H<sub>max</sub>, R<sub>max</sub> y tiempos de latencia ajustados a Gompertz

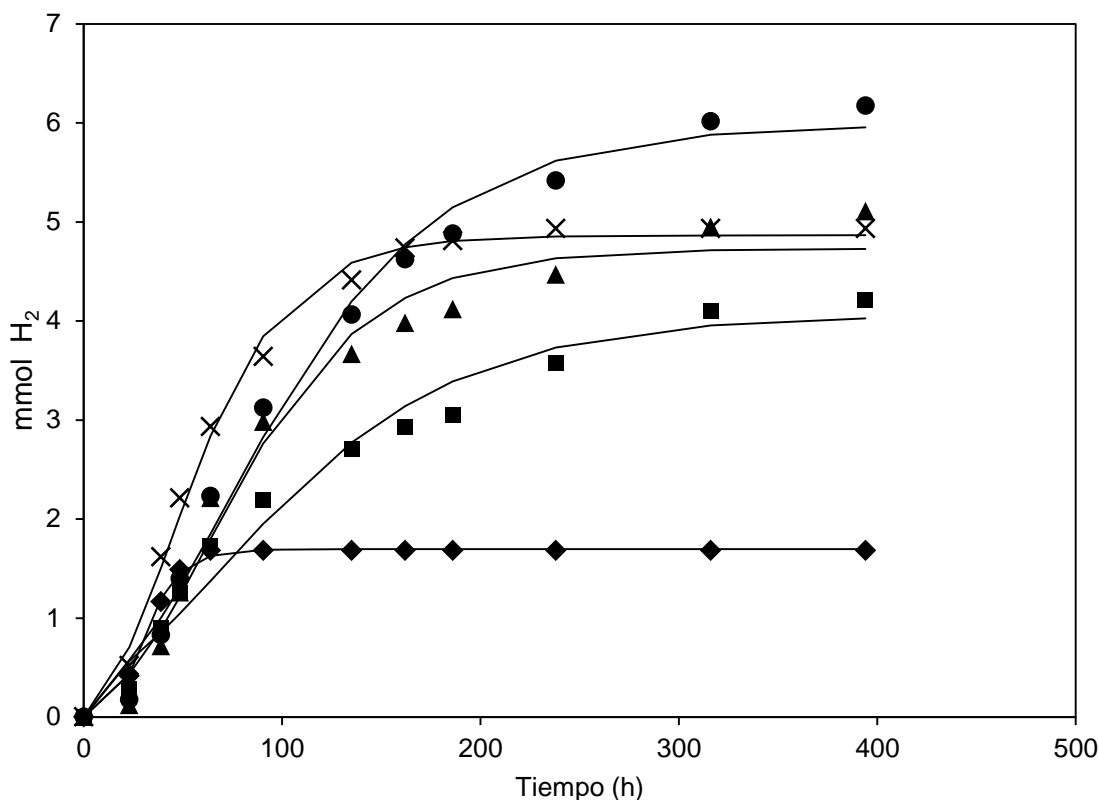
Corrida	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	H <sub>max</sub> de H <sub>2</sub> (mmol)	R <sub>max</sub> de H <sub>2</sub> (mmol/d)	Fase de latencia (h)
				Gompertz	Gompertz	
1	0	0	0	5.00	0.84	1
2	0	0	0	5.00	0.99	15
3	-1	1	0	4.06	0.57	6
4	-1	0	-1	1.38	0.96	17
5	0	1	1	5.13	0.64	1
6	-1	0	1	3.88	0.54	22
7	0	0	0	4.42	0.73	8
8	0	1	-1	1.83	0.62	34
9	0	-1	-1	1.70	1.18	22
10	0	-1	1	4.96	0.61	10
11	1	0	-1	1.70	1.29	15
12	1	0	1	4.73	0.92	17
13	1	1	0	5.98	0.89	14
14	1	-1	0	4.87	1.34	12
15	-1	-1	0	4.06	0.53	1



**Figura 3.9.** Curvas de producción de hidrógeno ajustadas a Gompertz del diseño experimental Box-Behnken para las pruebas: 1 (◆), 2 (▲), 3 (●), 4 (×) y 5 (■).



**Figura 3.10.** Curvas de producción de hidrógeno ajustadas a Gompertz del diseño experimental Box-Behnken para las pruebas: 6 (◆), 7 (▲), 8 (●), 9 (×) y 10 (■).



**Figura 3.11.** Curvas de producción de hidrógeno ajustadas a Gompertz del diseño experimental Box-Behnken para las pruebas: 6 (◆), 7 (▲), 8 (●), 9 (×) y 10 (■).

A partir del análisis de regresión de superficie de los datos ajustados a Gompertz se obtuvieron los coeficientes de regresión estimados para las ecuaciones para la máxima producción específica de hidrógeno ( $H_{max}$ ) (Ec. 8) y de la máxima velocidad de producción de hidrógeno ( $R_{max}$ ) (Ec. 9) utilizando datos en unidades sin codificar.

$$H_{max} = 4.526 E^{-4} X_1 - 6.845 E^{-3} X_2 + 1.146 E^{-2} X_3 - 2.203 E^{-7} X_1 X_1 + 1.721 E^{-5} X_2 X_2 - 6.51 E^{-6} X_3 X_3 + 2.285 E^{-6} X_1 X_2 + 2.427 E^{-7} X_1 X_3 + 2.056 E^{-7} X_2 X_3 - 0.20168 \quad (8)$$

$$R_{max} = 2.096 E^{-4} X_1 + 8.421 E^{-4} X_2 - 8.201 E^{-4} X_3 + 5.675 E^{-8} X_1 X_1 - 7.714 E^{-6} X_2 X_2 + 1.279 E^{-8} X_3 X_3 - 1.009 E^{-6} X_1 X_2 + 2.852 E^{-8} X_1 X_3 + 2.695 E^{-6} X_2 X_3 + 1.00249 \quad (9)$$

Donde  $X_1$  es la concentración inicial de ácido acético,  $X_2$  es la concentración inicial de ácido butírico y  $X_3$  la concentración inicial de ácido propiónico.

El valor del coeficiente de regresión para  $H_{max}$  y  $R_{max}$  fue de 97.66 y de 93.49% respectivamente. Lo que indica que los coeficientes obtenidos son los más adecuados para

predecir los valores del sistema de producción de hidrógeno y los valores teóricos encontrados serán lo más cercano a los resultados.

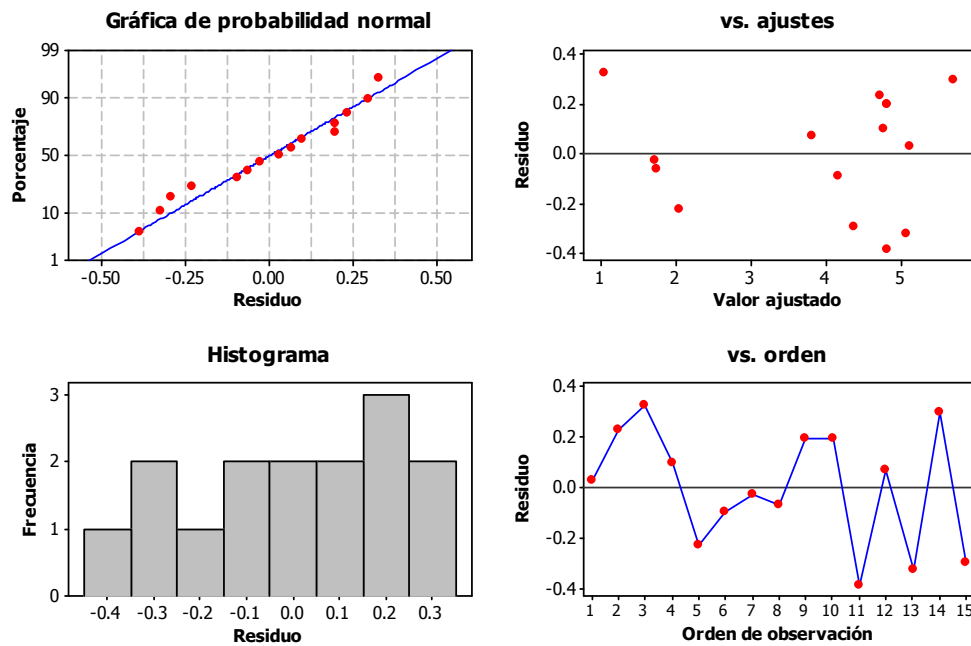
El análisis de datos para la producción específica de hidrógeno ( $H_{\max}$ ) se hizo utilizando las unidades codificadas. El valor del coeficiente de regresión ( $R^2 = 97.66\%$ ) cercano a uno, indica que los coeficientes obtenidos son los más adecuados para predecir los valores del sistema de producción de hidrógeno y los valores teóricos encontrados serán lo más cercano a los resultados. De igual forma es importante destacar la poca diferencia encontrada entre el  $R^2$  y  $R^2$ -ajustado, lo cual indica una concordancia aceptable entre los datos experimentales y los ajustados a través del modelo. Los resultados obtenidos a partir del análisis de superficie de respuesta, la distribución T, los valores de P, y las estimaciones de los coeficientes dan en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3.** Coeficientes de regresión estimados de  $H_{\max}$ .

Término	Coef	SE Coef	T	P
Constante	4.8067	0.2224	21.616	0.000
Ac. acético	0.4852	0.1362	3.564	0.016
Ac. butírico	0.1786	0.1362	1.312	0.247
Ac. propiónico	1.5124	0.1362	11.107	0.000
Ac. acético*Ac. acético	-0.2714	0.2004	-1.354	0.234
Ac. butírico*Ac. butírico	0.2083	0.2004	1.039	0.346
Ac. propiónico*Ac. propiónico	-1.6112	0.2004	-8.038	0.000
Ac. acético*Ac. butírico	0.2790	0.1926	1.449	0.207
Ac. acético*Ac. propiónico	0.1340	0.1926	0.696	0.518
Ac. butírico*Ac. propiónico	0.0112	0.1926	0.058	0.956
R-cuad. = 97.66%		R-cuad.(ajustado) = 93.44%		

Los valores P se utilizan como una herramienta para verificar la significancia de cada uno de los coeficientes, que a su vez, puede indicar los patrones de la interacción entre las variables. Aumentar la magnitud de T y un valor menor P, indica que el coeficiente correspondiente es más significativo. Los coeficientes de las variables individuales (ácido acético, butírico y propiónico) mostraron que el aumento de la concentración inicial de los tres sustratos ( $X_1=0.4852$ ,  $X_2=0.1786$  y  $X_3=1.5124$ ) aumentó la producción de hidrógeno. Se halló que el efecto lineal de la concentración de ácido propiónico inicial ( $X_3$ ) era altamente significativa ( $P=0.000$ ) en la producción de hidrógeno. El coeficiente del término cuadrático de la concentración inicial de ácido propiónico ( $X_3^2$ ) ( $P=0.000$ ) se encontró que era significativo. El efecto interactivo de ácido acético y butírico, acético y propiónico y butírico y propiónico se observó que era poco significativo.

En la Figura 3.12 se observan las gráficas de residuo las cuales son el resultado de graficar los residuos que son los valores observados menos los valores ajustados. En la gráfica de probabilidad normal se puede notar que la mayoría de los puntos caen sobre la línea normal, lo que indica que los residuos se han distribuido normalmente. Mediante el histograma de los residuos se puede encontrar cierta simetría con lo que se descarta valores atípicos y anomalías. Para la gráfica de los residuales contra los valores ajustados se puede identificar una tendencia de la varianza de los residuales a aumentar conforme la producción de hidrógeno aumenta. Finalmente, después de analizar la gráfica de los residuales contra el orden de las observaciones, se puede asegurar que cumple la independencia de las variables, al no observarse un patrón claro. El análisis anterior ayuda a validar el diseño experimental para la producción específica de hidrógeno.



**Figura 3.12.** Gráficas de residuos para  $H_{max}$ .

La Tabla 3.4 muestra el análisis de la varianza (ANOVA) resumen del modelo para la producción específica de hidrógeno. El análisis ANOVA se requiere para probar la significancia y pertinencia del modelo. Los cuadrados medios se obtienen dividiendo la suma de los cuadrados de cada una de las dos fuentes de variación, el modelo y la varianza del error, por los respectivos grados de libertad. El ANOVA del modelo de regresión demuestra que el modelo es altamente significativo, como es evidente a partir del valor F calculado (23.16) y un

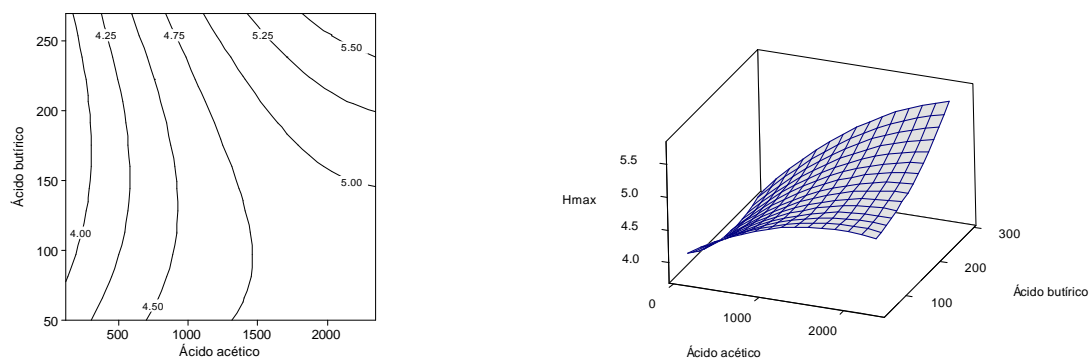
valor de probabilidad muy baja (modelo  $P < F = 0.001$ ). Se observó que el coeficiente de efecto lineal y cuadrado son altamente significativos ( $P = 0.000, 0.002$ ).

**Tabla 3.4.** Análisis de varianza de  $H_{max}$ .

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Regresión	9	30.9256	30.9256	3.4362	23.16	0.001
Lineal	3	20.24372	20.24372	6.8124	45.92	0.000
cuadrado	3	10.1047	10.1047	3.3682	22.71	0.002
interacción	3	0.3837	0.3837	0.1279	0.86	0.518
Error residual	5	0.7417	0.7417	0.1483		
Falta de ajuste	3	0.5174	0.5174	0.1725	1.54	0.417
Error puro	2	0.2243	0.2243	0.1121		
Total	14					

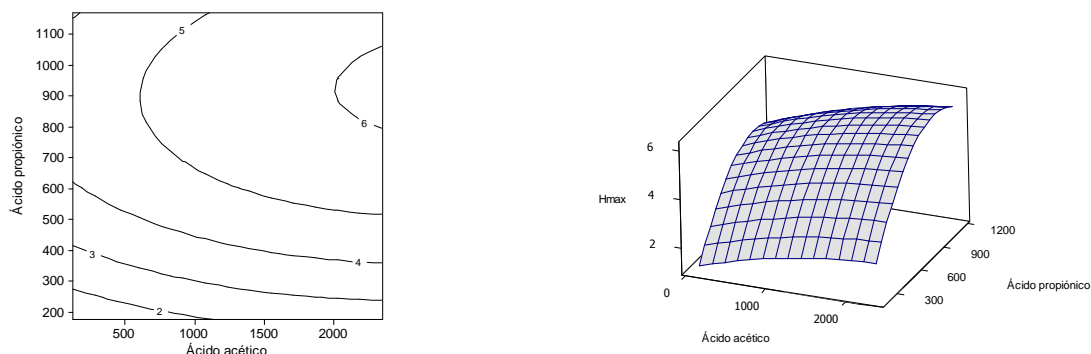
Las representaciones gráficas de contorno y de superficie de respuesta se obtuvieron utilizando el software Minitab 15. Las gráficas de contorno y superficie son útiles para establecer valores de respuesta y condiciones operativas deseables. Una gráfica de contorno provee una vista bidimensional donde todos los puntos tienen la misma respuesta y están conectados para producir líneas de contorno de respuestas constantes. Las gráficas de superficie proveen una vista tridimensional que puede suministrar una imagen más clara de la superficie de respuesta.

Las Figuras 3.13, 3.14 y 3.15 muestran las gráficas de contorno y de superficie de respuesta para los tres efectos interactivos para la producción específica de hidrógeno con valores no codificados. La Figura 3.13 muestra el efecto interactivo de ácido acético y la concentración inicial de ácido butírico. Se observa en la gráfica de contorno y en la de superficie que la interacción entre estos dos ácidos presenta buena producción de hidrógeno a concentraciones de 2000 mg/L de ácido acético y de 150-270 mg/L de ácido butírico.



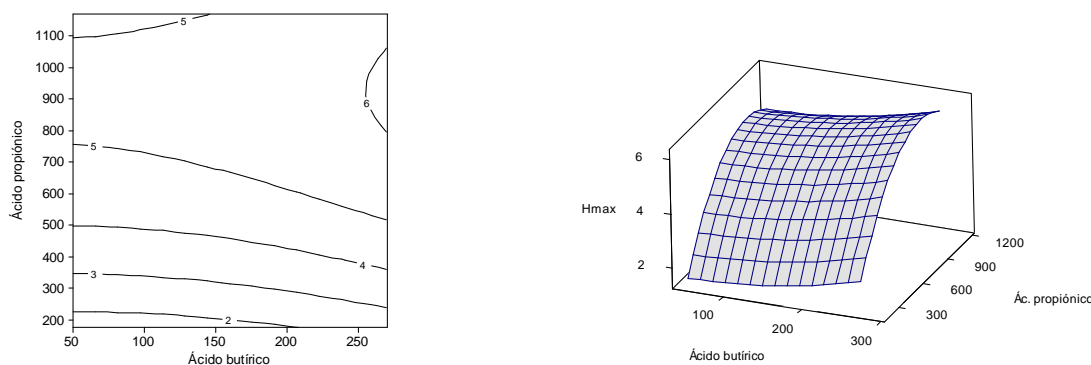
**Figura 3.13.** Gráfica de contorno y de superficie de respuesta para  $H_{max}$  que muestra el efecto interactivo de la concentración de ácido acético y la concentración de ácido butírico.

La Figura 3.14 muestra el efecto interactivo del ácido acético y la concentración inicial de ácido propiónico en la producción específica de hidrógeno. La naturaleza elíptica del contorno indica que esta interacción es importante en la respuesta. Una buena producción de hidrógeno se observa a concentraciones de 2000 mg/L de ácido acético y 900 mg/L de ácido propiónico aproximadamente.



**Figura 3.14.** Gráfica de contorno y de superficie de respuesta para  $H_{max}$  que muestra el efecto interactivo de la concentración de ácido acético y la concentración de ácido propiónico.

En la Figura 3.15 se observa el efecto interactivo del ácido butírico y la concentración inicial de ácido propiónico en la producción de hidrógeno. En la gráfica de contorno encontramos un punto silla o minimax. La naturaleza no lineal de las curvas de nivel implica que la interacción de la concentración de ambos ácidos es importante. Aquí se encuentra un buen rendimiento a los 250 mg/L de ácido butírico y 900 mg/L de ácido propiónico aproximadamente.



**Figura 3.15.** Gráfica de contorno y de superficie de respuesta para  $H_{max}$  que muestra el efecto interactivo de la concentración de ácido butírico y la concentración de ácido propiónico.

De igual forma que para la producción específica de hidrógeno ( $H_{max}$ ) se realizó el análisis estadístico completo a las velocidades de producción de hidrógeno ( $R_{max}$ ). El análisis de datos se hizo utilizando las unidades codificadas. El valor del coeficiente de regresión  $R^2$  obtenido



en el análisis estadístico fue de 93.49 %. Los resultados obtenidos a partir del análisis de superficie de respuesta, la distribución T, los valores de P, y las estimaciones de los coeficientes se dan en la Tabla 3.5.

**Tabla 3.5.** Coeficientes de regresión estimados de  $R_{\max}$ .

Término	Coef	SE Coef	T	P
Constante	0.8536	0.0667	12.790	0.000
Ac. acético	0.2302	0.0409	5.633	0.002
Ac. butírico	-0.1166	0.0409	-2.853	0.036
Ac. propiónico	-0.1674	0.0409	-4.095	0.009
Ac. acético*Ac. acético	0.0699	0.0601	1.162	0.298
Ac. butírico*Ac. butírico	-0.0933	0.0601	-1.551	0.182
Ac. propiónico*Ac. propiónico	0.0031	0.0601	0.053	0.960
Ac. acético*Ac. butírico	-0.1232	0.0578	-2.132	0.086
Ac. acético*Ac. propiónico	0.0157	0.0578	0.272	0.796
Ac. butírico*Ac. propiónico	0.1475	0.0578	2.552	0.051
R-cuad. = 93.49%		R-cuad.(ajustado) = 81.78%		

Los coeficientes de las variables individuales mostraron para el caso del ácido acético que el aumento de la concentración inicial ( $X_1= 0.2302$ ) aumentó la velocidad de producción de hidrógeno. Para el ácido butírico y ácido propiónico el aumento de la concentración inicial ( $X_2= -0.1166$  y  $X_3 = -0.1674$ ) disminuyó la velocidad de producción de hidrógeno. Se halló que el efecto lineal de la concentración de ácido acético inicial ( $X_1$ ) y la concentración inicial de ácido propiónico ( $X_3$ ) era altamente significativa ( $P=0.002$ ,  $0.009$ ) para la velocidad de producción de hidrógeno. Los coeficientes de términos cuadráticos de la concentración inicial de los tres ácidos resultaron ser no significativos. El efecto interactivo de ácido acético y butírico, acético y propiónico y butírico y propiónico se observó que era poco significativo.

En la Figura 3.16 se encuentran las gráficas de residuo para el análisis estadístico de la velocidad de producción de hidrógeno y por medio de las cuales se valida este sistema.

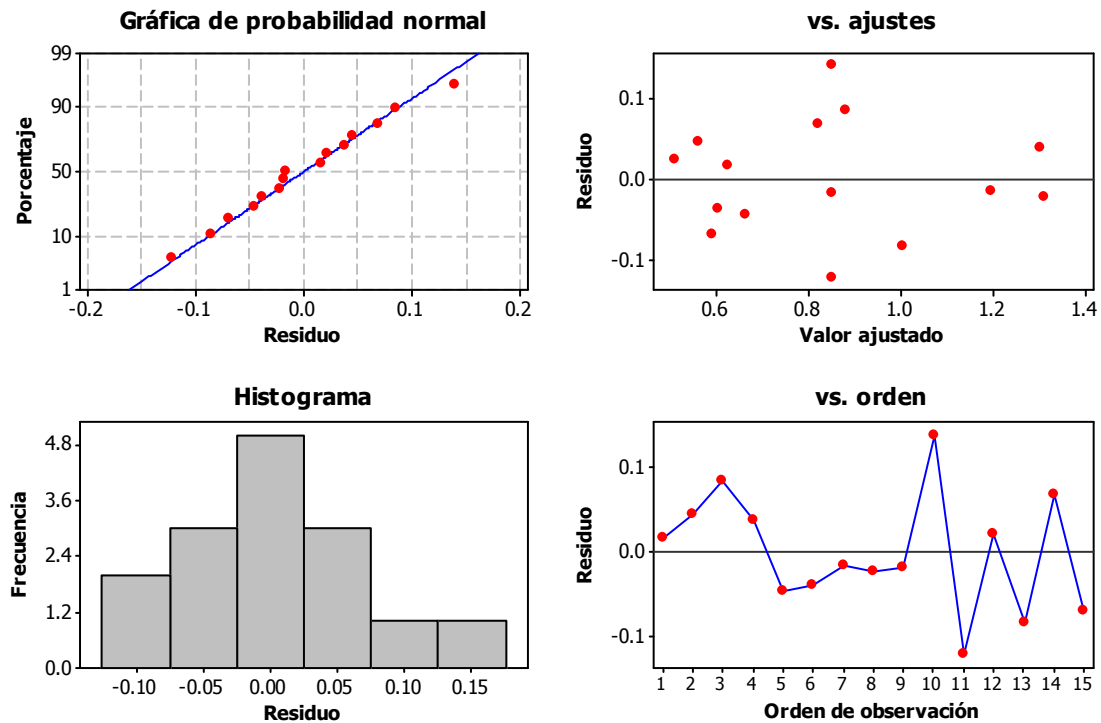


Figura 3.16. Gráficas de residuos para  $R_{max}$ .

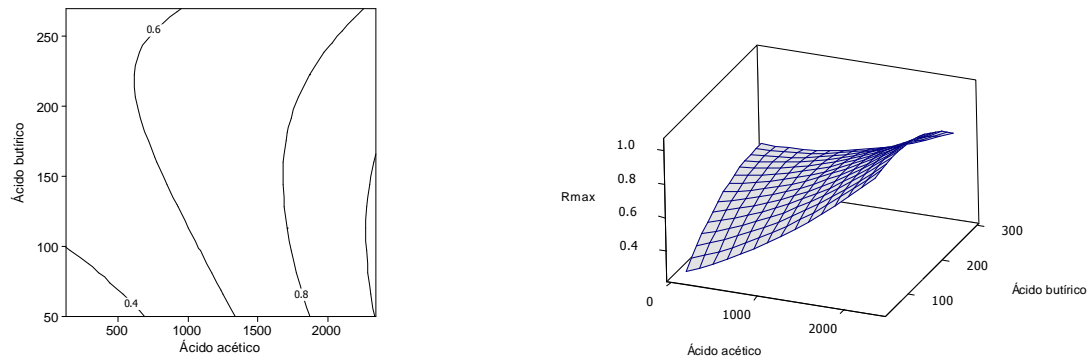
La Tabla 3.6 muestra el análisis de la varianza (ANOVA), resumen del modelo para la velocidad de producción de hidrógeno. El ANOVA del modelo de regresión demuestra que el modelo es altamente significativo, como es evidente a partir del valor F calculado (7.98) y un valor de probabilidad muy baja (modelo  $P < F = 0.017$ ). Se observó que el coeficiente de efecto lineal es altamente significativo ( $P = 0.004$ ).

Tabla 3.6. Análisis de varianza de  $R_{max}$ .

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Regresión	9	0.9601	0.1067	0.0106	7.98	0.017
Lineal	3	0.7570	0.2523	0.2523	18.88	0.004
cuadrado	3	0.0543	0.0181	0.0181	1.36	0.357
interacción	3	0.1487	0.0495	0.0496	3.71	0.096
Error residual	5	0.0668	0.0133	0.0133		
Falta de ajuste	3	0.0323	0.0107	0.0107	0.62	0.664
Error puro	2	0.0345	0.0172	0.0172		
Total	14	1.0270				

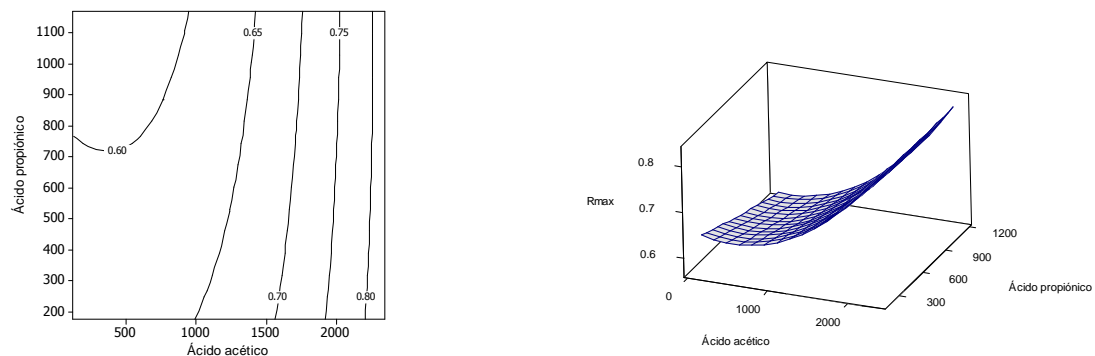
Las Figuras 3.17, 3.18 y 3.19 muestran las gráficas de contorno y de superficie de respuesta para los tres efectos interactivos con la velocidad de producción de hidrógeno. La Figura 3.19 muestra el efecto interactivo de ácido acético y la concentración inicial de ácido butírico en la velocidad de hidrógeno producido. La gráfica de contorno y la de superficie de respuesta

muestran parte de un punto silla que la mejor velocidad se presenta a los 2000 mg/L de ácido acético y 200 mg/L de ácido butírico aproximadamente.



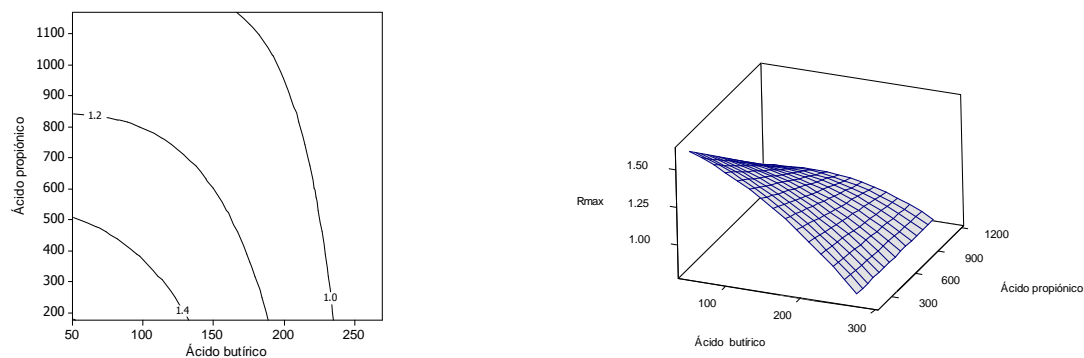
**Figura 3.17.** Gráfica de contorno y de superficie de respuesta para  $H_{max}$  que muestra el efecto interactivo de la concentración de ácido acético y la concentración de ácido butírico.

La Figura 3.18 muestra el efecto interactivo del ácido acético y la concentración inicial de ácido propiónico en la producción específica de hidrógeno. La naturaleza elíptica del contorno indica que esta interacción es importante en la respuesta. Las gráficas muestran que la mejor velocidad se encuentra a concentraciones de 500 mg/L de ácido acético y 1100 mg/L de ácido propiónico aproximadamente.



**Figura 3.18.** Gráfica de contorno y de superficie de respuesta para  $H_{max}$  que muestra el efecto interactivo de la concentración de ácido acético y la concentración de ácido propiónico.

La Figura 3.19 muestra el efecto interactivo del ácido butírico y la concentración inicial de ácido propiónico en la producción específica de hidrógeno. De igual forma que en la gráfica de contorno anterior se aprecia que las curvas tienen una naturaleza elíptica por lo que esta interacción es importante en la respuesta del sistema. Se observa que buenas velocidades de producción pueden ser obtenidas a concentraciones inferiores de 500 mg/L de ácido propiónico y de 120 mg/L de butírico.



**Figura 3.19.** Gráfica de contorno y de superficie de respuesta para  $H_{\max}$  que muestra el efecto interactivo de la concentración de ácido butírico y la concentración de ácido propiónico.

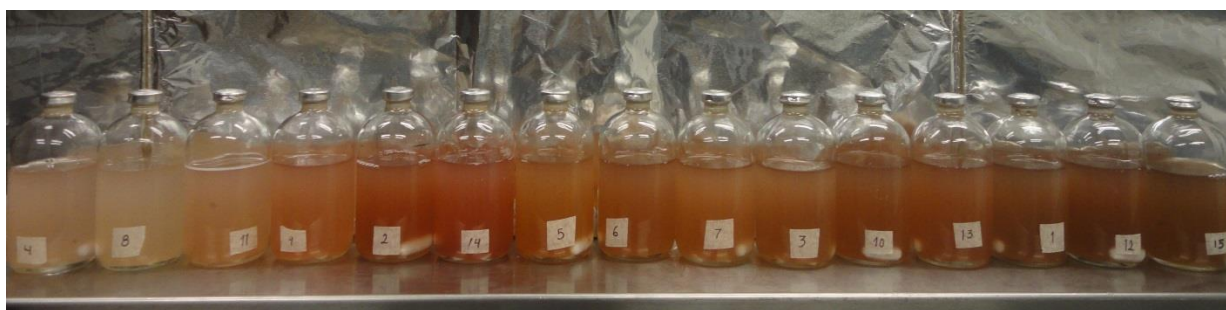
La tasa de producción máxima de hidrógeno obtenida fue de 1.34 mmol  $H_2$ /d y la mejor producción específica de hidrógeno fue de 5.98 mmol de  $H_2$ . En la Tabla 3.7 se presentan para las 15 pruebas: las remociones de DQO, la biomasa obtenida, el tiempo de latencia, pH y nitrógeno amoniacal. Las concentraciones de nitrógeno amoniacal formado durante el tiempo que duró la prueba osciló entre los 0.63 y 2.62 mg/L, con este resultado existe la posibilidad de que se haya presentado inhibición por este compuesto ya que de acuerdo a lo reportado por Koku et al. (2002) y por Argun y Kargi (2011) se puede presentar este problema desde concentraciones de 0.36 mg/L. Se presentaron tiempo de latencia variados el menor de ellos fue de 1 h y el mayor de 34 h. Las remociones de DQO variaron, la mejor remoción fue de 87.80 % y la más baja fue de 41.63 %, Tao et al. en 2008 reportaron remociones de DQO de 80 % pero usando una nueva bacteria púrpura no azufrada llamada ZX-5. El pH se mantuvo estable a lo largo de la prueba aumentando hasta un máximo de 7.2 para una de las botellas.

En el caso de la biomasa se puede observar en la Figura 3.20 las variaciones en las coloraciones para cada una de las botellas presentándose los característicos colores rojo, guinda y marrón. La cantidad de biomasa fue medida indirectamente por densidad óptica a 660 nm y los resultados se encontraron en el rango de 541 y 913 mg/L de SST. La muestra que presentó la mayor concentración de biomasa fue la que estuvo compuesta por 1235 mg/L de ácido acético, 270 mg/L de ácido butírico y 175 mg/L de ácido propiónico, esto discrepa del estudio realizado por Sangeetha y Karunanithi en 2010 quienes obtuvieron 920 mg/L como la máxima concentración de biomasa para *Rhodobacter Sphaeroides* con 534 mg/L de ácido

acético, 763 mg/L de ácido butírico y 639 mg/L de ácido propiónico. Las purzas promedio se encontraron entre los 77 y 84 % de pureza de H<sub>2</sub>.

**Tabla 3.7.** Valores obtenidos al final del diseño experimental Box-Behnken.

Orden Corrida	Concentración (mg/L)			Remoción de DQO (%)	Biomasa final (mg/L)	pH	N-NH <sub>3</sub> (mg/L)	Pureza promedio H <sub>2</sub> (%)
	Ácido acético	Ácido butírico	Ácido Propiónico					
1	1235	270	1170	72.11	792	7	1.19	81
2	1235	50	1170	73.68	849	7	0.75	81
3	125	160	175	69.55	561	6.9	0.63	79
4	2345	50	672.5	34.29	541	7	1.55	77
5	1235	270	175	48.58	913	6.9	0.82	84
6	125	270	672.5	41.63	577	7	0.7	81
7	1235	50	175	63.93	706	7	0.66	80
8	2345	160	175	54.67	655	7	0.83	80
9	1235	160	672.5	59.74	603	7	1.31	78
10	1235	160	672.5	48.55	890	7	0.61	81
11	1235	160	672.5	66.80	737	7.2	2.62	79
12	125	160	1170	47.84	823	7	0.93	83
13	2345	160	1170	68.33	707	7	0.78	81
14	2345	270	672.5	68.60	889	7.3	1.38	81
15	125	50	672.5	87.80	743	6.9	0.77	80



**Figura 3.20.** Botellas serológicas al final de las 394 h que duró la actividad experimental.

### 3.2.1.1 Optimización de respuesta del diseño experimental Box-Behnken

La aplicación de un modelo de optimización se llevó a cabo con el programa Minitab 15. Los valores óptimos de las variables de prueba correspondientes a la máxima producción específica y velocidad de producción de hidrógeno (4.9 mmol y 1.27 mmol/d) en unidades no

codificadas como  $X_1= 2345$ ,  $X_2= 50$  y  $X_3 = 715$ , estos datos presentaron una conveniencia compuesta de 0.98, valor cercano a 1 y permite asegurar que el resultado es confiable. Por tanto la única concentración óptima que se encontró fue la del ácido propiónico a los 715 mg/L, este comportamiento sugiere una inhibición de la producción de hidrógeno por el ácido propiónico cuando se alimenta a concentraciones mayores.

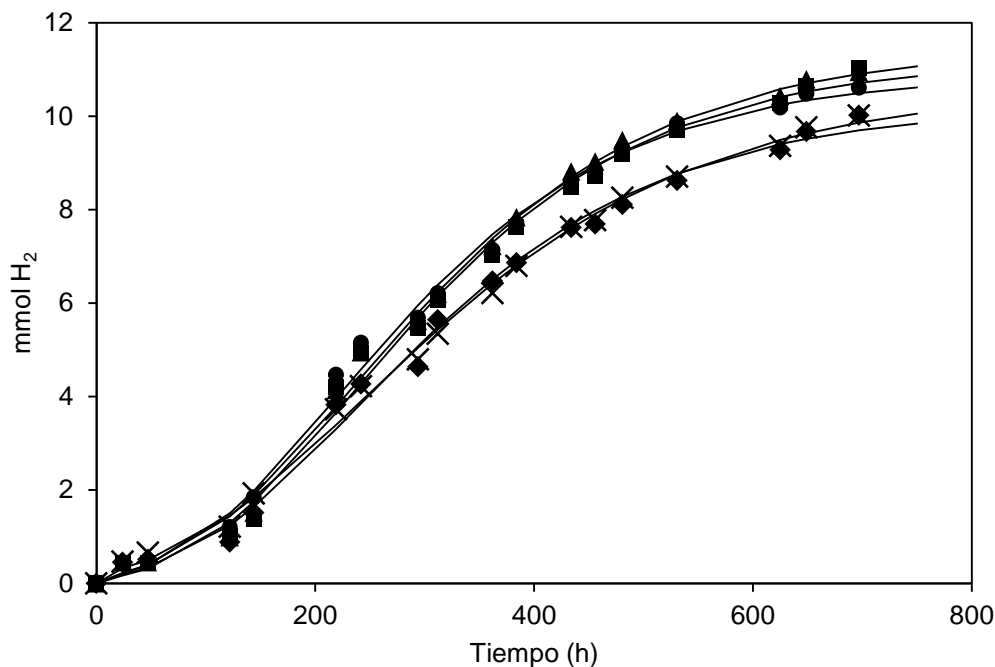
### 3.2.2 Central Compuesto

Para la segunda etapa experimental la concentración de ácido propiónico se mantuvo fija en 715 mg/L. Se utilizó el diseño experimental del tipo Central-Compuesto y sólo se variaron las concentraciones de ácido acético y butírico. Los valores codificados de las variables de la prueba y los resultados experimentales (modelo de Gompertz) de la producción específica de hidrógeno, de la velocidad máxima de producción de  $H_2$  y del tiempo de latencia se presentan en la Tabla 3.8 para cada una de las 13 pruebas realizadas, las cuales se arrancaron en un mismo lote.

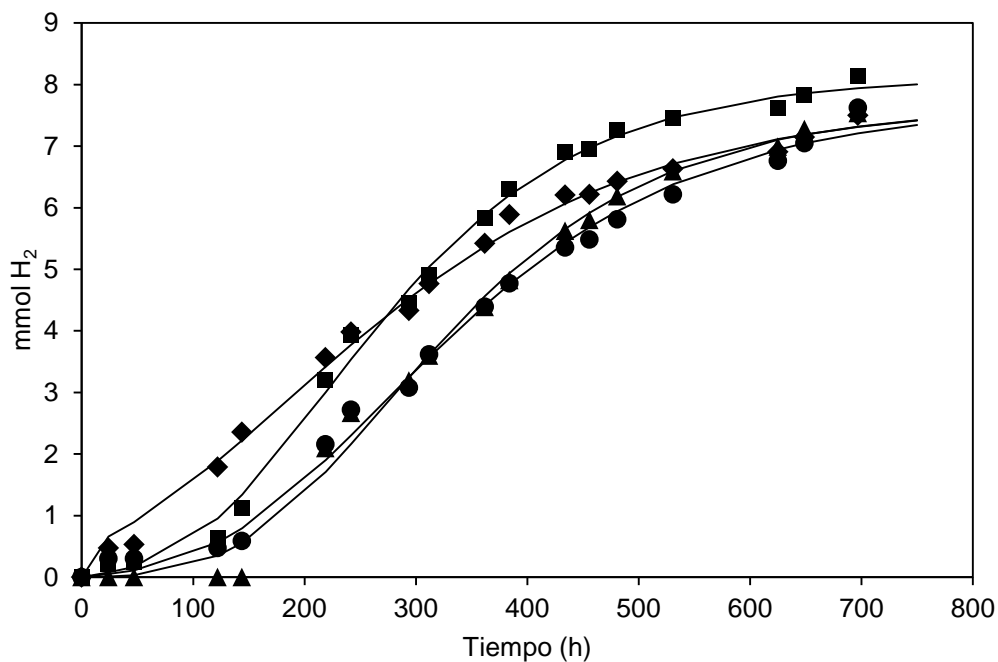
**Tabla 3.8.** Diseño experimental Central-Compuesto con los valores de  $H_{max}$ ,  $R_{max}$  y tiempo de latencia ajustados a Gompertz.

Corrida	$X_1$	$X_2$	$H_{max}$ de $H_2$ (mmol)	$R_{max}$ de $H_2$ (mmol/d)	Fase de latencia (h)
1	0	-1.414	7.72	0.39	6
2	1	-1	7.68	0.44	116
3	0	0	11.21	0.66	87
4	-1	1	8.13	0.57	92
5	1	1.414	7.63	0.50	139
6	-1.414	0	9.46	0.63	76
7	1	1	7.63	0.51	177
8	0	0	10.22	0.58	82
9	0	0	11.47	0.65	80
10	0	0	10.63	0.61	67
11	-1	-1	8.13	0.53	37
12	1.414	0	7.99	0.44	91
13	1	0	10.89	0.66	76

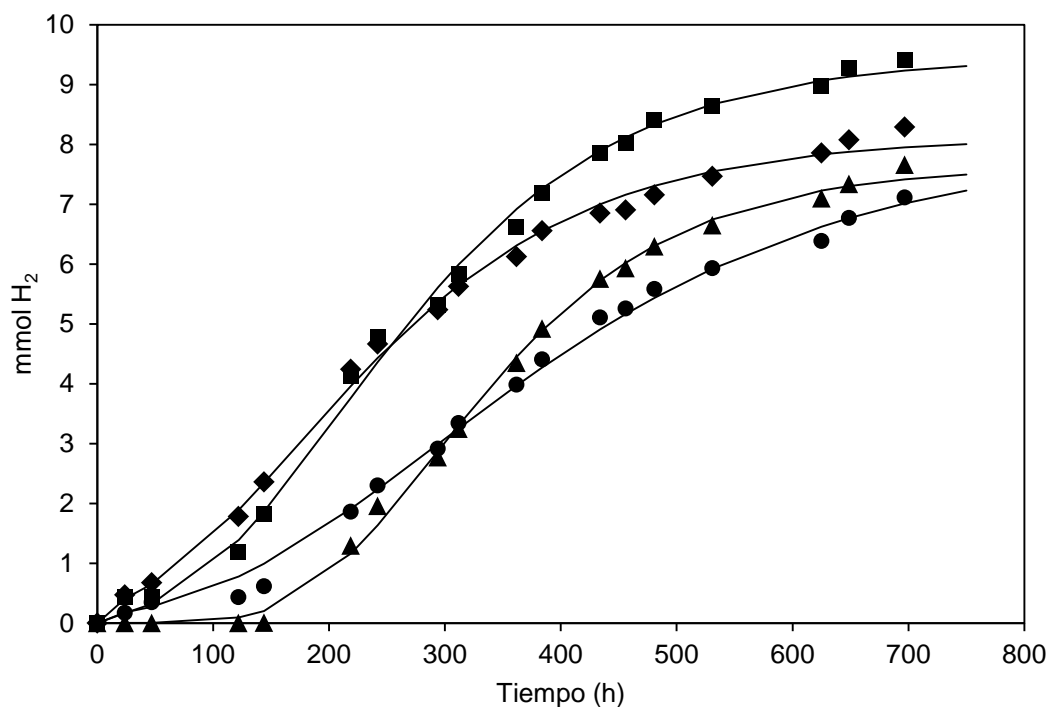
Las Figuras 3.21, 3.22 y 3.23 muestran las curvas de producción de hidrógeno ajustadas al modelo de Gompertz para las 13 pruebas realizadas. Todo el análisis de datos se realizó mediante el software Minitab 15.



**Figura 3.21.** Curvas de producción de hidrógeno ajustadas a Gompertz de los 5 puntos centrales del diseño experimental central compuesto pruebas: 3 (■), 8 (◆), 9 (▲), 10 (×) y 13 (●).



**Figura 3.22.** Curvas de producción de hidrógeno ajustadas a Gompertz del diseño experimental Central-Compuesto para las pruebas: 1 (◆), 2 (●), 4 (■) y 5 (▲).



**Figura 3.23.** Curvas de producción de hidrógeno ajustadas a Gompertz del diseño experimental Box-Behnken para las pruebas: 6 (■), 7 (▲), 11 (◆) y 12 (●).

A partir del análisis de regresión de superficie de los datos ajustados a Gompertz se obtuvieron los coeficientes de regresión estimados para las ecuaciones para la máxima producción específica de hidrógeno ( $H_{\max}$ ) (Ec. 10) y de la máxima velocidad de producción de hidrógeno ( $R_{\max}$ ) (Ec. 11) utilizando datos en unidades sin codificar.

$$H_{\max} = 5.074 + 3.108 E^{-3} X_1 + 5.038 E^{-3} X_2 - 1.156 E^{-6} X_1 X_1 - 1.681 E^{-6} X_2 X_2 - 1.116 E^{-6} X_1 X_2 \quad (10)$$

$$R_{\max} = 0.428 + 4.598 E^{-5} X_1 + 2.205 E^{-4} X_2 - 4.781 E^{-8} X_1 X_1 - 7.192 E^{-8} X_2 X_2 + 2.679 E^{-8} X_1 X_2 \quad (11)$$

Donde  $X_1$  es la concentración inicial de ácido acético y  $X_2$  es la concentración inicial de ácido butírico.

El valor del coeficiente de regresión para  $H_{\max}$  y  $R_{\max}$  fue de 95.36 y de 90.89 % respectivamente, esto indica que los coeficientes obtenidos son pertinentes para predecir los valores del sistema de producción de hidrógeno y los valores teóricos encontrados serán lo más cercano a los resultados.



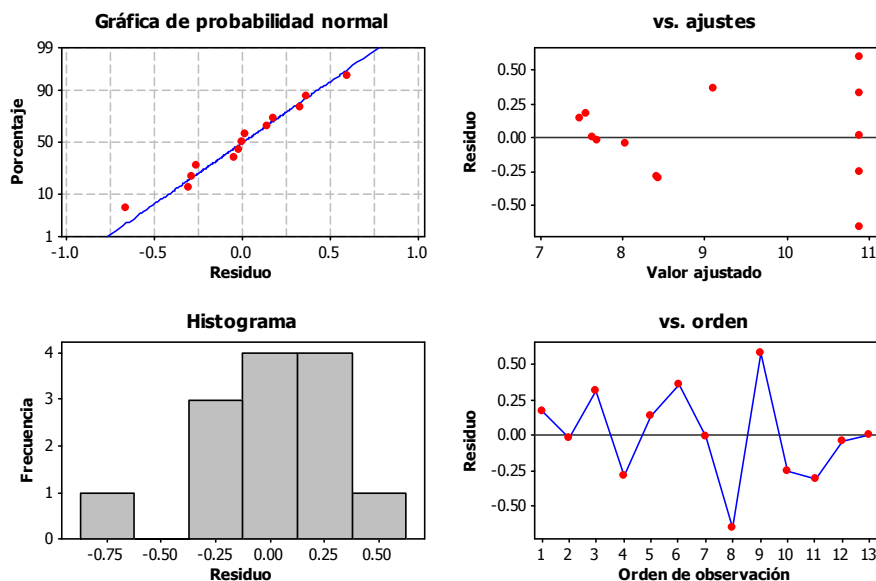
El análisis de datos para la producción específica de hidrógeno ( $H_{\max}$ ) se hizo utilizando las unidades codificadas. El valor del coeficiente de regresión ( $R^2 = 97.66\%$ ) cercano a uno, muestra que los coeficientes obtenidos son los más adecuados para predecir los valores del sistema de producción de hidrógeno y los valores teóricos encontrados serán lo más cercano a los resultados. Es importante destacar la poca diferencia encontrada entre el  $R^2$  y  $R^2$ -ajustado, lo cual indica una concordancia aceptable entre los datos experimentales y los ajustados a través del modelo. Los resultados obtenidos a partir del análisis de superficie de respuesta, la distribución T, los valores de P, y las estimaciones de los coeficientes dan en la Tabla 3.9.

**Tabla 3.9.** Coeficientes de regresión estimados de  $H_{\max}$ .

Término	Coef	SE Coef	T	P
Constante	10.8839	0.1938	56.161	0.000
Ac. acético	-0.3776	0.1532	-2.465	0.043
Ac. butírico	-0.0214	0.1532	-0.139	0.893
Ac. acético*Ac. acético	-1.1563	0.1643	-7.037	0.000
Ac. butírico*Ac. butírico	-1.6808	0.1643	-10.230	0.000
Ac. acético*Ac. butírico	-0.0112	0.2167	-0.052	0.960
R-cuad. = 95.36%		R-cuad.(ajustado) = 92.04%		

Al observar los coeficiente de las variables individuales se encontró que el aumento de la concentración inicial de los dos sustratos ( $X_1 = -0.3776$ ,  $X_2 = -0.0214$ ) disminuyó la producción de hidrógeno. Se halló que el efecto lineal de la concentración de ácido acético inicial ( $X_1$ ) era significativo ( $P=0.043$ ) en la producción de hidrógeno. Los coeficientes de los términos cuadráticos de las concentraciones iniciales de ácido acético y butírico ( $X_1^2$  y  $X_2^2$ ) ( $P=0.000$ ,  $P=0.000$ ) se encontró que eran significativas. El efecto interactivo de ácido acético y butírico, no es significativo.

En la Figura 3.24 se observan las gráficas de residuo las cuales como en el análisis anterior aseguran la validez del sistema de la tasa específica de producción de hidrógeno.



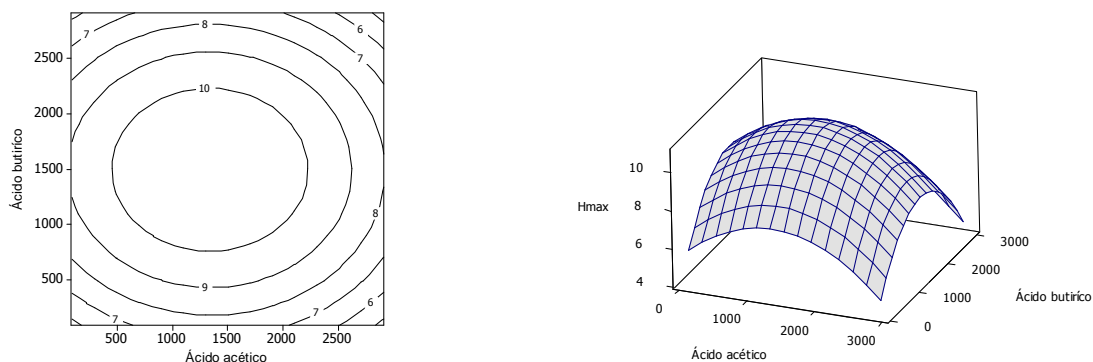
**Figura 3.24.** Gráficas de residuos para  $H_{max}$ .

La Tabla 3.10 muestra el análisis de la varianza (ANOVA) resumen del modelo para la producción específica de hidrógeno. El ANOVA del modelo de regresión demuestra que el modelo es altamente significativo, como es evidente a partir del valor F calculado (28.77) y un valor de probabilidad muy baja (modelo  $P < F = 0.000$ ). Se observó que el coeficiente del efecto cuadrado es altamente significativo ( $P = 0.000$ ).

**Tabla 3.10.** Análisis de varianza de  $H_{max}$ .

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Regresión	5	27.0113	27.0113	5.4023	28.77	0.000
Lineal	2	1.1444	1.1444	0.5722	3.05	0.112
cuadrado	2	25.8664	25.8664	12.9332	68.87	0.000
interacción	1	0.0005	0.0005	0.0005	0.00	0.960
Error residual	7	1.3145	1.3145	0.1878		
Falta de ajuste	3	0.3603	0.3603	0.1201	0.50	0.700
Error puro	4	0.9542	0.9542	0.2386		
Total	12	28.3258				

La Figura 3.25 muestra las gráficas de contorno y de superficie de respuesta se muestra el efecto interactivo de ácido acético y la concentración inicial de ácido butírico en la producción específica de hidrógeno. La naturaleza elíptica del contorno indica que esta interacción es importante en la respuesta y que una producción de 10 mmol de  $H_2$  puede ser obtenida con 1500 mg/L de ácido butírico y 1300 mg/L de ácido acético aproximadamente.



**Figura 3.25.** Gráfica de contorno y de superficie de respuesta para  $H_{max}$  que muestra el efecto interactivo de la concentración de ácido acético y la concentración de ácido butírico.

El análisis de datos para la velocidad de producción de hidrógeno ( $R_{max}$ ) se hizo utilizando las unidades codificadas. El valor del coeficiente de regresión ( $R^2 = 90.89\%$ ) cercano a uno, muestra que los coeficientes obtenidos son los pertinentes para predecir los valores del sistema de velocidad de producción de hidrógeno. Los resultados obtenidos a partir del análisis de superficie de respuesta, la distribución T, los valores de P, y las estimaciones de los coeficientes dan en la Tabla 3.11.

**Tabla 3.11.** Coeficientes de regresión estimados de  $R_{max}$ .

Término	Coef	SE Coef	T	P
Constante	0.6333	0.0164	38.568	0.000
Ácido acético	-0.0518	0.0129	-3.993	0.005
Ácido butírico	0.0353	0.0129	2.718	0.030
Ácido acético*Ac. acético	-0.0436	0.0139	-3.136	0.016
Ácido butírico*Ac. butírico	-0.0891	0.0139	-6.401	0.000
Ácido acético*Ac. butírico	0.0074	0.0183	0.407	0.696
R-cuad. = 90.89%		R-cuad.(ajustado) = 84.39%		

Al observar los coeficiente de las variables individuales se encontró que el aumento de la concentración inicial del ácido acético ( $X_1 = -0.0518$ ) disminuyó la velocidad producción de hidrógeno y el aumento de la concentración inicial del ácido butírico ( $X_2 = -0.0353$ ) aumentó la velocidad de producción de hidrógeno. Se halló que el efecto lineal de la concentración de los sustratos ( $X_1$  y  $X_2$ ) era significativo ( $P = 0.005$  y  $P = 0.030$ ) en la velocidad de producción. Los coeficientes de los términos cuadráticos de las concentraciones iniciales de ácido acético y butírico ( $X_1 * X_1$  y  $X_2 * X_2$ ) ( $P = 0.016$ ,  $P = 0.000$ ) se encontró que eran altamente significativas. El efecto interactivo de ácido acético y butírico, no se mostró significativo.

En la Figura 3.26 se pueden observar nuevamente las gráficas de residuo que aportaron de forma visual la validez de la velocidad de producción de hidrógeno en el diseño experimental.

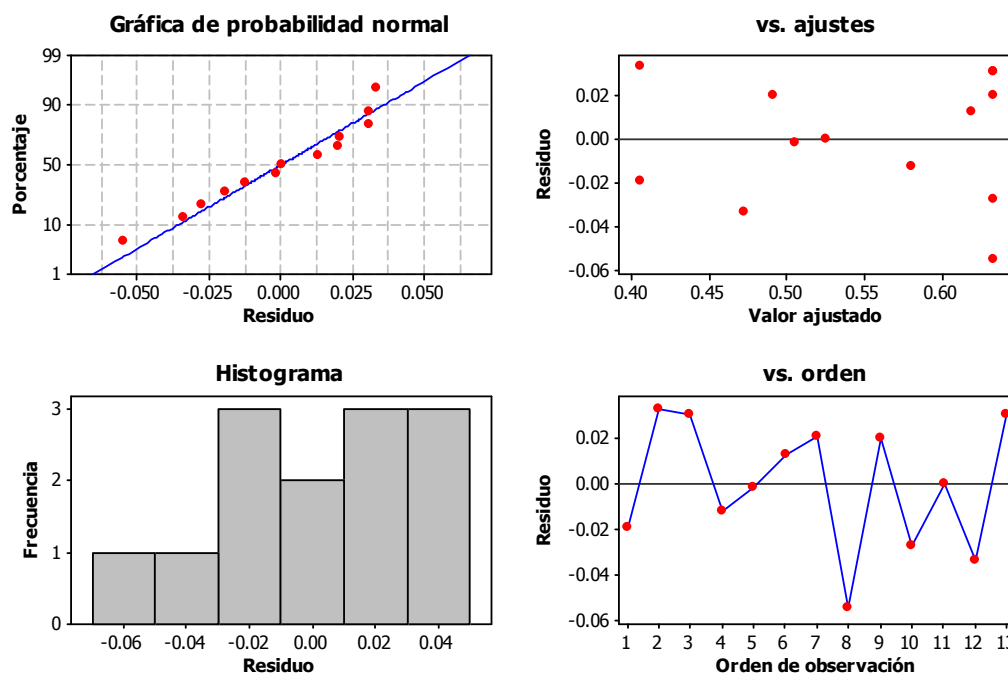


Figura 3.26. Gráficas de residuos para  $R_{max}$ .

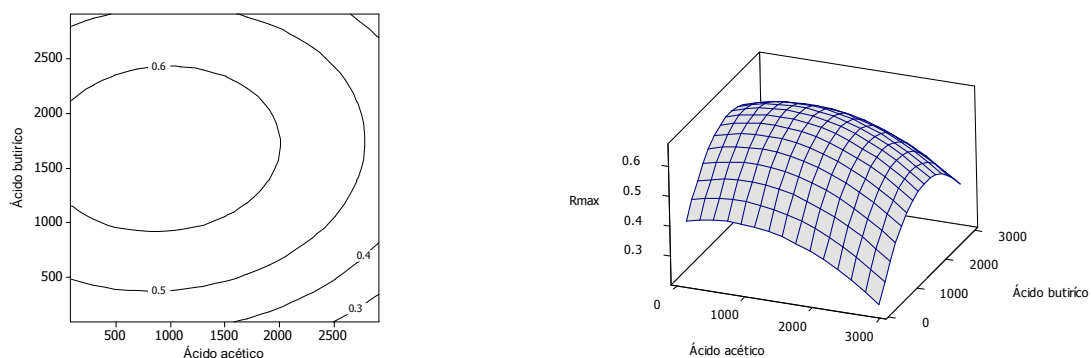
La Tabla 3.12 muestra el análisis de la varianza (ANOVA) resumen del modelo para la velocidad de producción de hidrógeno. El ANOVA del modelo de regresión demuestra que el modelo es altamente significativo, como es evidente a partir del valor F calculado (13.97) y un valor de probabilidad muy baja (modelo  $P < F = 0.002$ ). Se observó que los coeficientes del efecto lineal y cuadrado son altamente significativos ( $P = 0.006$ ,  $P = 0.001$ ).

Tabla 3.12. Análisis de varianza de  $H_{max}$ .

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
Regresión	5	0.0942	0.0942	0.0188	13.97	0.002
Lineal	2	0.0314	0.0314	0.0157	11.67	0.006
cuadrado	2	0.0625	0.0625	0.0312	23.18	0.001
interacción	1	0.0002	0.0002	0.0002	0.17	0.696
Error residual	7	0.0094	0.0094	0.0013		
Falta de ajuste	3	0.0033	0.0033	0.0011	0.74	0.581
Error puro	4	0.0061	0.0061	0.0015		
Total	12					

La Figura 3.27 muestra las gráficas de contorno y de superficie de respuesta. Se muestra el efecto interactivo de ácido acético y la concentración inicial de ácido butírico en la velocidad de

producción de hidrógeno. La naturaleza elíptica del contorno indica que esta interacción es importante en la respuesta y se puede encontrar la mejor velocidad de producción entre los 1000 y 1500 mg/L aproximadamente de ácido acético y butírico respectivamente. Se concluye la validez del diseño experimental y a partir de las gráficas se puede predecir que al aplicar el modelo de optimización el resultado serán las dos respuestas óptimas esperadas.



**Figura 3.27.** Gráfica de contorno y de superficie de respuesta para  $R_{\max}$  que muestra el efecto interactivo de la concentración de ácido acético y la concentración de ácido butírico.

En la Tabla 3.13 se presentan para cada una de las 13 pruebas: las remociones de DQO, la biomasa obtenida, el tiempo de latencia y nitrógeno amoniacal. Se presentaron tiempo de latencia variados el menor de ellos fue de 6 h y el mayor de 177 h. Las purezas promedio de hidrógeno se ubicaron entre el 83 y 87 % encontrándose en el rango que han sido reportadas por diversos autores; Argun y Kargi (2011) y Eroglu et al. (2008) reportaron purezas del 95 % de hidrógeno usando una cepa pura de *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 y como sustrato malato. Por otro lado Li (2008) alcanzó a partir de un lodo fototrófico purezas de entre el 80 y 90 % de hidrógeno.

Las remociones de DQO variaron de acuerdo a la prueba, la mejor remoción fue de 69.67 % y la más baja fue de 37.58%. En el caso de la biomasa se puede observar en la Figura 3.28 coloraciones muy fuertes para cada una de las botellas presentándose un guinda como color característico. La cantidad de biomasa fue medida por densidad óptica a 660 nm y los resultados se encontraron en el rango de 1.19 y 3.76 mg/L de SST. La muestra que presentó la mayor concentración de biomasa fue la que estuvo compuesta por 2500 mg/L de ácido acético, 2500 mg/L de ácido butírico y 715 mg/L de ácido propiónico.

**Tabla 3.13.** Resultados obtenidos al final del diseño experimental Central Compuesto

Orden Corrida	Concentración (mg/L)			Remoción de DQO (%)	Biomasa final (g/L)	N-NH <sub>3</sub> (mg/L)	Pureza promedio (% H <sub>2</sub> )
	Ácido acético	Ácido Propiónico	Ácido butírico				
1	1500	715	85.8	69.43	1.24	0.4	83
2	2500	715	500	60.88	2.54	0.4	84
3	1500	715	1500	64.74	2.83	0.5	86
4	500	715	2500	37.58	2.56	3.0	85
5	1500	715	2914.2	45.49	3.13	1.0	85
6	85.8	715	1500	57.55	1.53	0.5	84
7	2500	715	2500	50.31	3.76	0.4	87
8	1500	715	1500	52.19	2.49	0.7	85
9	1500	715	1500	59.63	2.37	0.8	85
10	1500	715	1500	55.98	2.48	0.9	85
11	500	715	500	69.67	1.19	10.8	83
12	2914.2	715	1500	50.63	3.45	0.9	85
13	1500	715	1500	56.82	2.60	0.7	84

Se obtuvieron producciones de hidrógeno que oscilaron entre los 76.3 y 114.7 mmol H<sub>2</sub>/L de cultivo, producciones que están en el rango y superan las reportadas por Nan-Qi et al. (2008) que oscilaron entre los 26.8 y 84.8 mmol H<sub>2</sub>/l de cultivo. Esos autores utilizaron una cepa pura de *Rhodopseudomonas faecalis* RLD-53 mantuvieron constante la concentración de acetato en 2051 mg/L y variaron la concentración de butirato en intervalos de 1.38, 2.75, 5.50, 8.26 y 11.0 g/L. Los valores obtenidos en el presente trabajo son mucho más altos que lo reportado Zampol Lazaro et al. (2012) quienes obtuvieron producciones en un rango de 5.6 a 13.9 mmol H<sub>2</sub>/L de cultivo usando diferentes ácidos orgánicos (acetato, butirato, citrato, lactato y malato) a pesar de que ambos inóculos están formados por consorcios mixtos. En cuanto a las velocidades de producción de hidrógeno obtenidas estas oscilaron de 0.35 a 1.34 mmol H<sub>2</sub>/d a lo largo de toda la experimentación, se encuentran dentro del rango reportado por Fang et al., en 2005 cuyas velocidades fueron de 0.03 a 1.37 mmol H<sub>2</sub>/d.

La tasa de producción máxima de hidrógeno obtenida fue de 6.6 mmol H<sub>2</sub>/d L, la producción específica molar fue de 0.66 mmol H<sub>2</sub>/d g de biomasa y la mejor producción específica de hidrógeno fue de 11.47 mmol de H<sub>2</sub>, al comparar estos resultados con la actividad

experimental observamos un aumento en la producción específica y una disminución en la velocidad de producción de hidrógeno ya que los resultados anteriores fueron de 5.98 mmol de  $H_2$  y 1.34 mmol  $H_2/d$ . La disminución en las velocidades de producción se relaciona con los altos tiempos de latencia que se presentaron durante la actividad experimental.



**Figura 3.28.** Botellas serológicas al final de las 697 h que duró la actividad experimental.

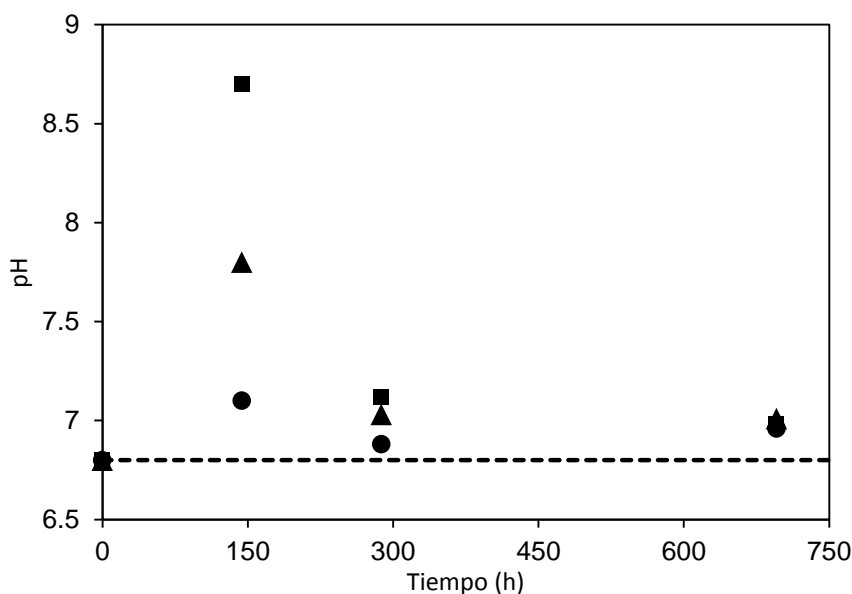
Las fases de latencia más largas se han relacionado con los cambios de pH que se presentaron durante la actividad experimental, estos cambios de pH dependieron de la formación de amonio en el medio, dado que las cantidades de nitrógeno usadas fueron más grandes para poder mantener la relación C/N de 16. En la Tabla 3.14 se puede observar los cambios de pH que hubo a lo largo del tiempo en los 13 experimentos, el primer aumento de pH presentado a las 144 h después de arrancadas las corridas fue el más drástico. En la Figura 3.29 se pueden observar estos cambios para 3 pruebas representativas; en general el pH aumento de 6.8 en todas las botellas a un rango de entre 7.1 y 8.7.

A valores de pH muy altos la producción de hidrógeno se ve disminuida e incluso inhibida. Según lo reportado por Basak y Das (2007) el rango de pH óptimo para la producción de

hidrógeno es de 6.8 – 7.5; Dasgupta et al. (2010) observaron que el pH óptimo debía rondar el 7. Al presentarse valores de pH superiores a 7 durante la prueba se observó que la generación de biogás era escasa o nula, por lo tanto se corroboró lo descrito por los autores anteriores. Se ajustó el pH a 6.8 con HCl 1 N en dos ocasiones a las 144 y 288 h de haber arrancado la prueba.

**Tabla 3.14.** Variación del pH durante la experimentación.

Corrida	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
0	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8
144	7.2	8.3	7.8	7.6	8.7	7.1	8.5	7.6	7.7	7.7	7.2	8.6	7.6
288	7.0	7.1	7.0	6.9	7.1	6.9	7.3	6.9	6.9	6.9	6.9	7.4	6.9
697	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	6.9	7.0	7.0



**Figura 3.29.** Gráfica de pH para las muestras: 5 (■), 6(●) y 3(▲). Después de cada medición el pH era ajustado a 6.8 (línea punteada).

El aumento de pH como se mencionó se relaciona a la generación de amonio en el medio, las concentraciones de nitrógeno amoniacal formado al final de la prueba oscilaron entre 0.4 y 10.8 mg /L, la inhibición por este compuesto se ha reportado por Koku et al. (2002) y por Argun y Kargi (2011) a partir de concentraciones de 0.36 mg/L. De igual forma que el aumento de pH, la presencia de amonio en el medio pudo haber sido el causante de una fase de



latencia más larga como lo reporta Tsygankov (2001) un exceso de amonio y otros compuestos utilizables de nitrógeno reprimen la síntesis de la nitrogenasa en las bacterias púrpura no azufradas. La neutralización de amonio a cloruro de amonio mediante la adición de ácido clorhídrico y el consumo del nitrógeno excedente, ocasionó que después de la 288 h de iniciada la prueba ya no hubiera sido necesario otro reajuste de pH, esto se dedujo a partir de producciones constantes de biogás.

### ***3.2.2.1 Optimización de respuesta del diseño experimental Central Compuesto***

La aplicación de un modelo de optimización se llevó a cabo con el programa Minitab 15. Los valores óptimos de las variables de prueba correspondientes a la máxima producción específica y velocidad de producción de hidrógeno (10.88 mmol y 0.65 mmol/d) en unidades no codificadas como  $X_1=1200$ ,  $X_2=1571$  estos datos presentaron una conveniencia compuesta de 0.99, valor cercano a 1 y que permite asegurar que el resultado es confiable. Con lo que se obtienen las mejores concentraciones en la producción de hidrógeno con 1200 mg/L de ácido acético, 1571 mg/L de ácido butírico y 715 mg/L de ácido propiónico.

Algunos autores como Chen et al. (2007), Laurinavichene et al. (2008) y Lee et al. (2007) han reportado que las concentraciones óptimas de ácidos grasos volátiles se encuentran entre los 1800 y 2500 mg/L de AGV's. Pero durante el presente trabajo se obtuvieron las mejores producciones de hidrógeno a concentraciones promedio de 3500 mg/L de ácidos grasos volátiles. Shi y Yu (2005) reportaron su condición óptima a 1800, 200 y 1000 mg/L de ácido acético, propiónico y butírico respectivamente sin embargo ellos trabajaron con una cepa pura de *Rhodopseudomonas capsulata*.

### 3.3 PRUEBAS PRELIMINARES EN REACTOR DE PANEL PLANO

El fotobiorreactor de escala laboratorio se arrancó y operó por un tiempo aproximado de 45 días pero debido a fallas en el diseño no se obtuvo una producción constante y representativa de biogás y después de 30 días se empezó a detectar metano con lo que se detuvo la operación del mismo.

Las razones por las cuales el reactor no operó correctamente fue que en el diseño no se incluyó un sistema de agitación que permitiera mantener homogenizado todo el medio, el material con el que fue construido (acrílico) se fue opacando y dañando con el avance del tiempo por efecto del calor y la intensidad luminosa producida por las lámparas.

De igual forma no se diseñó el reactor de panel plano con un sistema que permitiera el gaseo con un gas inerte y de ese modo fomentar el ambiente anaerobio dentro del medio.

## CONCLUSIONES

El consorcio mixto productor de hidrógeno que contenía mayoritariamente bacterias púrpura no azufradas fue obtenido a partir de un sistema bioelectroquímico productor de hidrógeno. Este consorcio presentó porcentajes de pureza de hidrógeno del 76 al 87 % y una producción específica de hidrógeno de 12.68 mmol H<sub>2</sub> y una velocidad de producción de 1.21 mmol H<sub>2</sub>/d usando únicamente ácido acético y butírico.

A partir del diseño experimental Box Behnken se encontraron interacciones entre los ácidos grasos volátiles pero para las condiciones propuestas sólo el ácido propiónico presentaba una influencia importante en la producción de hidrógeno. Este inhibe la tasa de producción de hidrógeno a concentraciones superiores de 715 mg/L.

Con el diseño central compuesto fue posible estimar las interacciones entre el ácido acético y butírico a través de los gráficos de contorno y superficie de respuesta. La aplicación del modelo de optimización permitió obtener las concentraciones óptimas para la producción de hidrógeno, siendo éstas 1200 mg/L de ácido acético, 1571 mg/L de ácido butírico y 715 mg/L de ácido propiónico. Para estos datos la máxima producción específica y velocidad de producción de hidrógeno fue de 10.88 mmol y 0.65 mmol/d respectivamente.

El reactor de tipo panel plano no funcionó adecuadamente por errores de diseño por no incluir un sistema de agitación que permitiera mantener homogenizado todo el medio, el material con el que fue construido (acrílico) no fue el correcto y no se podía fomentar el microambiente aerobio dentro del reactor.

## Productos generados

### Congresos

Cardeña, R., Moreno, G., y Buitrón, G. (10-12 de abril de 2013). *Influence of volatile fatty acids concentration on photo-fermentative hydrogen production*. Formato póster. 2do. Congreso Iberoamericano sobre Biorefinerías. Jaén, España.

Cardeña, R., Moreno, G., y Buitrón, G. (24-26 de abril de 2013). *YWP 22 Optimización de la productividad de hidrógeno en un proceso fotofermentativo variando las concentraciones de ácidos Grasos Volátiles*. Presentación oral. Congreso de la IWA – Young Water Professionals México 2013. San Luis Potosí, México.

Cardeña, R., Moreno, G., Moreno-Andrade I. y Buitrón, G. (23-28 de junio de 2013). *Selection of a consortium for the photo-fermentative hydrogen production*. Formato póster. XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Cancún, México.

### Artículos sometidos

Cardeña, R., Moreno, G., Moreno-Andrade I. y Buitrón, G. (2013). *Selection of a consortium for the photo-fermentative hydrogen production*. Bioresource Technology.

Cardeña, R., Moreno, G., y Buitrón, G. (2013). *Effect of volatile fatty acids concentration on photo-fermentative hydrogen production*. Bioresource Technology.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Akkerman, I., Janssen, M., Rocha, J. y Wiffels, R. (2002). Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1195-208.
- Allakhverdiev, S., Thavasi, V., Kreslavski, V., Zharmukhamedov, S., Klimov, V., Ramakrishna, S. y otros. (2010). Photosynthetic hydrogen production. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 11, 87-99.
- Atlas, R. (2001). *Principles of microbiology*. New York: Mosby editions.
- Argun, H. y Kargi, F. (2010). Photo-fermentative hydrogen gas production from dark fermentation effluent of ground wheat solution: effects of light source and light intensity. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 1595-603.
- Argun, H. y Kargi, F. (2011). Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 7443-7459.
- Argun, H., Kargi, F. y Kapdan, I. (2008). Light fermentation of dark fermentation effluent with intermittent feeding and effluent removal. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 7405-12.
- Basak, N. y Das, D. (2007). The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art. *World Journal Microbiol Biotechnol*, 23, 31-42.
- Basak, N. y Das, D. (2009). Photofermentative hydrogen production using purple non-sulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in an annular photobioreactor: A case study. *Biomass and Bioenergy*, 33, 911-919.
- Brentner, L., Peccia, J. y Zimmerman, J. (2010). Challenges in developing biohydrogen as sustainable energy source: implications for a research agenda. *Environmental Science Technology*, 44, 2243-2254.
- Buitrón, G. y Carvajal, C. (2010). Biohydrogen production from Tequila vinasses in an aerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 101, 9071-9077.
- Cammack, R., y Frey, M. (2001). *Hydrogen as a fuel: learning from nature*. New York: Taylor and Francis editions.

- Chen, C. y Chang, J. (2006). Enhancing phototrophic hydrogen production by solid-carrier assisted fermentation and internal optical fiber illumination. *Process Biochemistry*, 41, 2041-49.
- Chen, C., Lu, W., Wu, J. y Chang, J. (2007). Enhancing phototrophic hydrogen production of *Rhodospseudomonas palustris* via statistical experiment design. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 940-9.
- Chen, C., Yang, M., Yeh, K., Liu, C. y Chang, J. (2008). Biohydrogen production using sequential dark and photo fermentation processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4755-62.
- Chen, C., Yeh, K., Lo, Y., Wang, H. y Chan, J. (2010). Engineering strategies for the enhanced photo-H<sub>2</sub> production using effluents of dark fermentation processes as substrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 13356-64.
- Das, D. y Veziroglu, T. (2001). Hydrogen production by biological processes: survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26, 13-28.
- Das, D. y Veziroglu, T. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 6046-57.
- Dasgupta, C., Gilbert, J., Lindblad, P., Heidorn, T., Borgvang, S., Skjanes, K., y otros. (2010). Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 10218-238.
- Dutta, D., De, D., Chaudhuri, S. y Bhattachayra, S. (2005). Hydrogen production by Cyanobacteria. *Microbial Cell Factories*, 4.
- Eroglu, I., Aslan, K., Gündüz, M., Yücel, M. y Türker, L. (1999). Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. *Journal Biotechnology*, 70, 103-113.
- Eroglu, I., Tabanoglu, A., Gündüz, U., Eroglu, E. y Yücel, M. (2008). Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in a flat plate solar bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 531-541.
- Fang, H., Liu, H. y Zhang, T. (2005). Phototrophic hydrogen production from acetate and butyrate in wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30, 785-793.
- Fascetti, E., D'addario, E., Todini, O. y Robertiello, A. (1998). Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 23, 753-60.

- HACH COMPANY. (2000). MANUAL DE ANÁLISIS DE AGUA. Procedimientos seleccionados del manual de Hach sobre análisis del agua Versión de la 3<sup>o</sup> edición en inglés. Segunda edición en español
- Han, H., Liu, B., Yang, H. y Shen, J. (2012). Effect of carbon sources on the photobiological production of hydrogen using *Rhodobacter sphaeroides* RV. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 12167-12174.
- Harley, P. y Prescott, M. (2004). *Microbiología* (5a. ed.). España: Mc Graw Hill.
- Hawkes, F., Dinsdale, R., Hawkes, D. y Hussy, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*(27), 1339-47.
- Hidayet, A., y Fikret, K. (2010). Photo-fermentative hydrogen gas production from dark fermentation effluent of ground wheat solution: Effects of light source and light intensity. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 1595-1603.
- Hoekema, S., Bijmans, M., Janssen, M., Tramper, J. y Wijffels, R. (2002). A pneumatically agitated flat-panel photobioreactor with gas re-circulation: anaerobic photoheterotrophic cultivation of a purple non-sulfur bacterium. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1331-8.
- Imhoff, J., Trüper, H. y Pfenning, N. (1984). Rearrangement of the Species and Genera of the Phototrophic "Purple Non Sulfur Bacteria". *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(3), 340-343.
- Jeong, T., Ch, G., Yeom, S. y Choi, S. (2008). Comparison of hydrogen production by four representative hydrogen-producing bacteria. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 14, 333-7.
- Kapdan, I. y Kargi, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzym Microb Technol*, 38, 569-82.
- Koku, H., Eroglu, I., Gündüz, U., Yücel, M. y Türker, L. (2002). Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1315-1329.
- Laurinavichene, T. V., Tekucheva, D. N., Laurinavichus, K. S., Ghirardi, M. L., Seibert, M. y Tsygankoc, A. A. (2008). Towards the integration of dark and photo fermentative waste treatment. 1. Hydrogen photoproduction by purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* using potential products of starch fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 7020-7026.

- Lee, J., Klaus, D., Maness, P.-C. y Spear, J. (2007). The effect of butyrate concentration on hydrogen production via photofermentation for use in a Martian habitat resource recovery process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32, 3301-3307.
- Levin, D., Pitt, L. y Love, M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of hydrogen Energy*, 29, 173-185.
- Lindquist, J. (08 de 11 de 2011). *Bacteriology 102: Enrichment and Isolation of Purple Non-Sulfur Photosynthetic Bacteria*. Recuperado el 2 de abril de 2013, de <http://www.splammo.net/bact102/102pnsb.html>
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. y Clark, D. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson.
- Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2000). *Brock Biology of Microorganisms* (ninth ed. ed.). New Jersey: Prentice Hall Inc.
- Manish, S., & Banerjee, R. (2008). Comparison of biohydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 279-286.
- Margalith, P. (1992). *Pigment microbiology*. London: Chapman & Hall.
- Microbiology Laboratories. (09 de 2012). *11-2 Isolation of photosynthetics*. Recuperado el 2 de 04 de 2013, de [http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=book&type=user&func=displayarticle&art\\_id=276](http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=book&type=user&func=displayarticle&art_id=276)
- Miyake, J., y Miyake, M. (1999). Biotechnological hydrogen production: research for efficient light energy conversion. *Journal of Biotechnology*, 70, 89-101.
- Myers, R., y Montgomery, D. (2002). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization using designed experiments*. USA: John Wiley & Sons.
- Montgomery, D. (2005). *Diseño y análisis de experimentos*. Editorial John Wiley & Sons, INC. Sexta Edición. Estados Unidos de América.
- Nan-Qi, R., Bing-Feng, L., Jie, D., Wan-Qian, G., Guang-Li, C. y Guo-Jun, X. (2008). The effect of butyrate concentration on photo-hydrogen production from acetate by *Rhodospseudomonas fecalis* RLD-53. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 5981-5985.
- Ortega-Valencia, E. y François-Lacouture, J. (2007). Producción de hidrógeno mediante energía nuclear, un escenario sostenible en México. En *XVIII Congreso Anual de la SM y XXV Reunión Anual de la SMSR*. Cancún, Quintana Roo.
- Pares, R., y Juárez, A. (1997). *Bioquímica de los microorganismos*. España: Reverte.



- Ru, Y. L., Tong, Z. y Herbert, H. F. (2008). Characteristics of a phototrophic sludge producing hydrogen from acetate and butyrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 2147-2155.
- Ruíz López, V. (2013). Celdas electroquímicas microbianas para la producción de hidrógeno a partir de los productos de la fermentación de aguas residuales Tesis doctoral inédita. *Universidad Nacional Autónoma de México*. México D.F. 2013
- Sangeetha, R. y Karunanithi, T. (2010). Optimization of Growth of Rhodobacter Sphaeroides Using Mixed Volatile Fatty Acids by Response Surface Methodology. *International Journal of Chemical and Biological Engineering*, 3(3), 115-118.
- Shi, X., y Yu, H. (2005). Optimization of glutamate concentration and pH for H<sub>2</sub> production from volatile fatty acids by Rhodospseudomonas capsulata. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 401-406.
- Shi, X., y Yu, H. (2006). Continuous production of hydrogen from mixed volatile fatty acids with Rhodospseudomonas capsulate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 1641-7.
- Srikanth, S., Venkata Mohan, S., Prathima Devi, M., Peri, D., y Sarma, P. (2009). Acetate and butyrate as substrates for hydrogen production through photo-fermentation: Process optimization and combined performance evaluation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 7513-7522.
- Staley, T., y Bryant, P. (1989). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Vol. 3). London: Board editorial.
- Stolp, H. (1996). *Microbial ecology: organisms, habitats, activities*. Great Britain: University of Cambridge.
- Tao, Y., He, Y., Wu, Y., Liu, F., Li, X., Zong, W. y otros. (2008). Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(3), 963-973.
- Tsygankov, A. (2001). Hydrogen photoproduction by purple bacteria: Immobilized vs. suspension cultures. En J. Miyake, T. Matsunaga, & A. San Pietro, *Biohidrogen II* (229-243). Pergamon.
- Uyar, B., Eroglu, I., Yucel, M. y Gunduz, U. (2009). Photofermentative hydrogen production from volatile fatty acids present in dark fermentation effluents. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 4517-23.
- Van Niel, C. (1944). The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriological reviews*, 8(1).

- Vignais, P., Colbeau, J., Willison, J. y Jouanneau, Y. (1985). Hydrogenase, nitrogenase and hydrogen metabolism in photosynthetic bacteria. *Advances in Microbial Physiology*(26), 154-234.
- Wang, X., Falcone, D. y Tabita , F. (1993). Reductive pentose phosphate-independent CO<sub>2</sub> fixation in *Rhodobacter sphaeroides* and evidence that ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activity serves to maintain the redox balance of the cell. *Journal of Bacteriology*, 11(175), 3372-3379.
- White, D. (2000). *The physiology and biochemistry of prokariotes* (2a. ed.). New York: Oxford University Press.
- Ying Li, R., Zhang, T. y Fang, H. (2008). Characteristics of a phototrophic sludge producing hydrogen from acetate and butyrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 9(33), 2147-2155.
- Zampol Lazaro, C., Vital Vich, D., Sumiko Hirasawa, J. y Amâncio Varesche, M. (2012). Hydrogen production and consumption of organic acids by a phototrophic microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 11691-11700.
- Zhang, K., Miyachi, S., y Kurano, N. (2001). Evaluation of a vertical flat-plate photobioreactor for outdoor biomass production and carbon dioxide bio-fixation: effects of reactor dimensions, irradiation and cell concentration on the biomass productivity and irradiation utilization efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 428-33.