

INSTITUTO POTOSINO  
DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.

---

**IPICYT**

**POSGRADO EN CIENCIAS APLICADAS**

**FORMACIÓN DE GRÁNULOS HIDROGENOGENÉTICOS EN UN  
REACTOR DE TANQUE AGITADO CONTINUO**

Tesis que presenta

**OMAR DANIEL CENTENO MANZO**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias Aplicadas**

En la opción de

**Ciencias Ambientales**

Director de tesis

**Dr. Elías Razo Flores**

**San Luis Potosí, S.L.P.**

**Enero de 2013**



## **Constancia de aprobación de la tesis**

La tesis “**Formación de gránulos hidrogenogénicos en un reactor de tanque agitado continuo**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales fue elaborada por **Omar Daniel Centeno Manzo** y aprobada el **18 de enero de 2013** por los suscritos, designados como Jurado de Tesis por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

**Dr. Elías Razo Flores**  
**Director de tesis**

---

**Dra. María de Lourdes Berenice Celis García**  
**Asesor de tesis**

---

**Dr. Felipe Alatraste Mondragón**  
**Asesor de tesis**

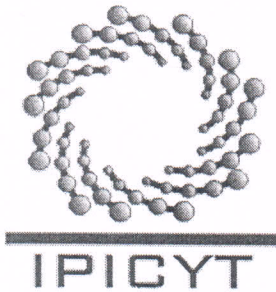


## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Elías Razo Flores.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Beca # 375477).

Este proyecto fue financiado mediante recursos del Proyecto SEP-CONACYT CB-2009-01, 132483 *“Producción de biohidrógeno en reactores de alta densidad celular”* asignado al Dr. Elías Razo Flores.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 065 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Aplicadas en la opción de Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 18 días del mes de enero del año 2013, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Felipe Alatraste Mondragón</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. María de Lourdes Berenice Celis García</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Elías Razo Flores</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS APLICADAS  
EN LA OPCION DE CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó el C.

**Omar Daniel Centeno Manzo**

sobre la Tesis intitulada:

*Formación de Gránulos Hidrogenogénicos en un Reactor de Tanque Agitado Continuo.*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Elías Razo Flores**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 18:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P. a los 18 días del mes de enero de 2013.



**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado



## Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a mis padres y hermana que me han impulsado y apoyado en todas las cosas que he querido hacer. A lxs hermanxs Evert, Piña, Yair, Pau y Sandy por aguantar las ausencias. A Alex por recorrer los kilómetros y estar, a Rafa porque la distancia no hace que nos olvidemos. A mis amigas y amigos que me han acompañado en cada paso y cada quebradero de cabeza, con detalle especial a aquellxs que me acompañaron estos dos años en la maestría: Arizbe, Monse, Emilia, Gaby, Marco, Omar, Malu, Mariana, Tere. A la otra familia temporal que me enseñó muchas cosas y detonó muchas más: Areli y Octavio. A lxs integrantes del Colectivo Vida Sobre Ruedas que me han compartido muchas cosas deseadas y queridas: Vamp, Fabi, Tuli, Ray, Kari, Paka, Rojo, Andrea, Xime, Julio, Iguana, Claudia, Motilla, Vanya, dani, pato, anaid y lucha... Sigamos proponiendo!

También se la dedico a Sofía quien me ha apoyado y con quien he compartido sueños vida y amor. A los integrantes de diferentes organizaciones civiles por enseñarme ese otro mundo posible en especial a EDUCIAC y lxs que ahí todos los días desarrollan su trabajo y creatividad para tener un mundo mas equitativo, justo y digno.

## **Agradecimientos**

Agradezco enormemente a Julián por todas sus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio, a Tere y Erika por toda la ayuda brindada y los momentos compartidos.

A todo el personal que labora en este instituto, en especial a mis asesores por los momentos de aprendizaje. A la M. en C. Dulce Isela de Fátima Partida Gutierrez, al M. en C. Guillermo Vidriales Escobar, al M. en C. Juan Pablo Rodas Ortíz y a la I.Q. María del Carmen Rocha Medina por el apoyo brindado en la parte práctica de mi trabajo en el IPICyT.

## ÍNDICE

Constancia de aprobación de Tesis ...i
Créditos institucionales...ii
Dedicatorias...iii
Agradecimientos...iv
Índice...v
Índice de Tablas...vii
Índice de Figuras...viii
Resumen...x
Abstract...xi

### **Capítulo I Marco Teórico**

#### **1. Introducción**

<b>1.1. El hidrógeno: un acarreador energético...12</b>
<b>1.2. Principales características del hidrógeno...13</b>
<b>1.3. Métodos de producción de hidrógeno...14</b>
<b>1.4. Producción biológica de hidrógeno...15</b>
1.4.1. Producción de hidrógeno por vía fermentativa...16
1.4.2. Vías metabólicas involucradas...17
1.4.3. Sistemas de producción de hidrógeno...19
<b>1.5. Teorías sobre la formación de gránulos...20</b>
1.5.1. Papel de los polímeros extracelulares...21
1.5.2. Inducción de la formación de agregados microbianos...22
<b>1.6. El quitosano...24</b>
1.6.1. Propiedades químicas del quitosano...24
<b>1.7. Justificación...26</b>
<b>1.8. Hipótesis...26</b>
<b>1.9. Objetivo General...27</b>
<b>1.9.1. Objetivos particulares...27</b>

### **Capítulo II. Materiales y Métodos**

#### **2. Metodología**

<b>2.1 Producción de hidrógeno en un cultivo en lote...28</b>
2.1.1. Inóculo...28
2.1.2. Medio de Cultivo...29
2.1.3. Cultivo en Lote...29
<b>2.2. Concentración óptima de quitosano y prueba de jarras...30</b>
2.2.1. Agente coagulante...30

2.2.2.	Prueba de jarras...	30
2.2.3.	Determinación de turbidez y sólidos sedimentables...	30
<b>2.3.</b>	<b>Producción de agregados microbianos en un reactor CSTR...</b>	<b>31</b>
2.3.1.	Arranque y operación del reactor...	31
2.3.2.	Prueba de granulación en continuo...	32
2.3.3.	Determinación del tamaño de partícula...	34
2.3.4.	Observación microscópicas...	35
2.3.5.	Extracción de polímeros extracelulares...	35
2.3.5.1.	Análisis químico de los Polímeros extracelulares...	35
<b>2.4.</b>	<b>Determinaciones analíticas...</b>	<b>36</b>
<b>Capitulo III Resultados y Discusión</b>		
<b>3. Resultados y Discusión</b>		
<b>3.1.</b>	<b>Producción de hidrógeno en cultivo en lote...</b>	<b>39</b>
<b>3.2.</b>	<b>Prueba de Jarras...</b>	<b>40</b>
3.2.1.	Efectividad en la reducción de la turbidez...	42
<b>3.3.</b>	<b>Inducción de la formación de agregados en un reactor CSTR...</b>	<b>46</b>
3.3.1.	Evaluación de la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) y AGV...	46
3.3.2.	Evaluación de la actividad de producción de hidrógeno en presencia de quitosano...	52
3.3.3.	Sólidos Sedimentables y Sólidos Volátiles...	53
3.3.4.	Producción de Polímeros Extracelulares...	56
3.3.5.	Distribución de tamaño de partícula...	59
3.3.6.	Observación de agregados mediante microscopia electrónica...	63
<b>Capitulo IV Conclusiones y Recomendaciones</b>		
<b>4. Conclusiones y recomendaciones</b>		
<b>4.1.</b>	<b>Conclusiones...</b>	<b>66</b>
<b>4.2.</b>	<b>Recomendaciones...</b>	<b>68</b>
<b>Capitulo V Bibliografía</b>		
<b>5.</b>	<b>Referencias bibliográficas...</b>	<b>69</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 2.1.** Concentración de las diferentes sales utilizadas para preparar el medio mineral adicionado a los diferente cultivos...**29**
- Tabla 2.2.** Condiciones para cada uno de los experimentos realizados para la formación de agregados microbianos mediante el uso de quitosano en un reactor completamente agitado...**33**
- Tabla 3.1.** Características de la producción de hidrógeno de diferentes trabajos reportados...**50**

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Extremo no reductor de una molécula de quitosano, formada exclusivamente por unidades de glucosamina eslabonadas por enlaces glicosídicos  $\beta$  (1-4)...**24**
- Figura 3.1.** Producción acumulada de hidrógeno (■) y gas (○) durante 36 h de incubación a 37 °C con un pH inicial de 7.5, en un cultivo en lote que contenía glucosa a una concentración de 25 g DQO/L como principal fuente de carbono...**40**
- Figura 3.2.** Determinación de la turbidez al minuto 1, 10, 20 y 30 a partir del momento en que se detuvo la agitación. La cantidad de quitosano adicionada fue: 5 (◆), 10 (x), 25 (▲), 50 (■), 100 (○) y 150 (●) mg de quitosano/L/g SV...**42**
- Figura 3.3.** Fotografía donde se observa la diferencia en la sedimentación y disminución de la turbidez en la prueba de jarras para la concentración de 25 mg quitosano/L/g SV (izquierda) y 150 mg quitosano/L/g SV (derecha)...**43**
- Figura 3.4.** Porcentaje de la reducción de turbidez para cada una de las concentraciones utilizadas al cabo de 30 min de reposo...**44**
- Figura 3.5.** Volumen de sólidos sedimentables en mL/L obtenidos a partir de la adición de quitosano en la prueba de jarras...**45**
- Figura 3.6.** Gráficas donde se muestran la producción de hidrógeno como VVPH (●) y la concentración de ácidos acético (○), propiónico (□) y butírico (▲) para los diferentes reactores a partir de la agregación de quitosano para la formación de gránulos. A) experimento I, B) experimento II, C) experimento III y D) experimento IV. La línea punteada indica el momento en que se agregó quitosano...**48**
- Figura 3.7.** Producción acumulada de hidrógeno en cultivo en lote antes (●) y después (▲) de haber agregado quitosano para formación de gránulos. La biomasa se obtuvo del reactor II. El porcentaje de hidrógeno en el biogás se mantuvo entre 50 y 60%...**53**
- Figura 3.8.** Perfil de la concentración de sólidos volátiles (▲) y sólidos sedimentables (□) en función del tiempo, para los experimentos: A) experimento II y B) experimento IV. La línea punteada indica el momento en el que se agregó quitosano, mientras la línea continua indica la tendencia de la concentración de los sólidos volátiles durante el experimento...**54**

**Figura 3.9.** Resultados de la concentración de proteínas (Ondas), carbohidratos (Puntos blancos fondo negro y punteada) y la relación proteínas/carbohidratos (P/C), (●). A) experimento II y B) experimento IV. La línea negra indica el tiempo al cual se agregó quitosano...57

**Figura 3.10.** Distribución del tamaño de partícula a partir de la aplicación de quitosano. A) experimento II presenta los datos antes de agregar quitosano (●), 1 hora después de haberlo agregado (■) y 65 horas después de agregar quitosano (▲) y B) experimento IV en donde se observa la distribución 4 horas antes de agregar quitosano (○) y después de agregar quitosano 8 horas (□) y 153 (▲) horas respectivamente...60

**Figura 3.11.** Observación en el microscopio electrónico de barrido de una gránulo formado después de 70 horas de haber agregado quitosano en el experimento III. A) observación global de la estructura granular a un aumento de 40X, B) presencia de una gran cantidad de polímeros extracelulares a 800X y C) células bacterianas inmersas en los biopolímeros a 6000X...64

**Figura 3.12.** Observación mediante SEM de tres gránulos obtenidos a partir de la aplicación de quitosano. A) observación global de la estructura granular a un aumento de 40X, B) presencia de una gran cantidad de polímeros extracelulares a 800X y C) células bacterianas inmersas en los biopolímeros a 6000X...65

## RESUMEN

Actualmente el desarrollo de tecnologías que permitan obtener combustibles alternativos se ha vuelto indispensable. En este contexto, el hidrógeno es considerado uno de los combustibles que pueden sustituir a los derivados del petróleo ya que su combustión produce 2.75 veces más energía que los hidrocarburos, su único producto es agua y puede obtenerse a partir de diferentes sustratos orgánicos utilizando el metabolismo de bacterias hidrogenogénicas mediante fermentación. El uso de reactores completamente agitados en donde se lleva a cabo el proceso de fermentación permiten una alta eficiencia en la transferencia de masa debido a un buen mezclado, sin embargo, presentan como limitante bajas concentraciones y pobre retención de biomasa cuando se manejan bajos tiempos de retención hidráulicos. Es por ello que se ha buscado el incremento en la concentración de biomasa mediante su retención en el sistema mediante la formación de gránulos, sin embargo, estos tardan meses en madurar por lo que es necesario buscar condiciones que aceleren este proceso. En este trabajo se evaluó el efecto del quitosano sobre la inducción en la formación de gránulos productores de hidrógeno en un sistema continuo completamente agitado, siendo el quitosano un polímero natural derivado de la quitina que actúa como un agente coagulante permitiendo la aglomeración de los microorganismos presentes en suspensión, con lo cual, se induce la granulación y el incremento de la producción de hidrógeno al aumentar la concentración de biomasa en el sistema. Para llevar a cabo la formación de gránulos se determinó la concentración de quitosano óptima para la coagulación de la biomasa en suspensión mediante la aplicación de una prueba de jarras, encontrando que la concentración fue de 10 mg de quitosano/L/g SV. La carga orgánica volumétrica aplicada en el reactor en continuo fue de 60 g/L/d utilizando glucosa como sustrato, alcanzando velocidades de producción de hidrógeno alrededor de 100 mL/L/d. Los resultados mostraron que la aplicación de quitosano como agente coagulante permite la agregación celular logrando obtener gránulos microbianos alrededor de 2 mm de diámetro, 70 horas después de adicionar el quitosano. La formación de agregados microbianos por efecto del quitosano generó un incremento aproximado de 3 veces la concentración inicial de sólidos volátiles, manteniendo un promedio alrededor de 8 g SV/L



## ABSTRACT

Nowadays, the development of technologies to obtain alternative fuels has become imperative. Within this context, hydrogen is considered one of the fuels that can supersede derivatives of petroleum as its combustion produces 2.75 times more energy than hydrocarbons, its only byproduct is water and it can be obtained from several organic substrates using hydrogenic bacterial metabolism by fermentation. The use of completely stirred tank reactors where fermentation process is carried out, allows high efficiency in mass transfer due to good mixing, nonetheless, it is limited to low concentrations and poor biomass retention when operating at low hydraulic retention times. One way to overcome this issue is by increasing the concentration of biomass via granules formation; however, the granules formation process may take months, so it is necessary to find conditions that accelerate this process. The present work evaluates the effect of chitosan inducing the formation of hydrogen-producing granules in a completely stirred continuous system. Being chitosan a chitin derivative natural polymer that serves as a coagulant agent, allowing agglomeration of suspended microorganisms and granules formation. The biomass increase in the system may also increase the volumetric hydrogen production rate. To accomplish the formation of granules, optimal chitosan concentration was determined for coagulation of biomass in suspension by applying a jar test, obtaining an optimal concentration of 10 mg chitosan/L/g VS. The volumetric organic load applied to the continuous reactor was 60 g/L/d using glucose as a substrate, reaching volumetric hydrogen production rates about 100 mL/L/d. Results showed that application of chitosan as coagulant agent allows cellular aggregation, obtaining microbial granules about 2 mm in diameter, 70 hours after addition of chitosan. The formation of microbial aggregates by the chitosan addition produced an increase of approximately 3 times the initial concentration of volatile solids, maintaining an average of about 8 g VS/L.

# Capítulo I

## Marco Teórico

### 1. INTRODUCCIÓN

#### 1.1. EL HIDRÓGENO: UN ACARREADOR ENERGÉTICO

Identificar y desarrollar un sistema sostenible de energía son dos de los problemas críticos en los que en la última década los investigadores de diferentes partes del mundo han puesto gran interés y en donde, reemplazar las fuentes de energía actuales por un combustible sustentable, es uno de los pasos clave. En este panorama el hidrógeno puede tener un papel fundamental en dicha transición ya que, al igual que la electricidad, puede producirse a partir de cualquier energía primaria (carbón, gas natural, hidrocarburos, nuclear, fuentes renovables). Además, se conoce al hidrógeno como un acarreador energético debido a que puede utilizarse directamente como combustible o ser transformado a electricidad mediante el uso de celdas de combustible y viceversa mediante el uso de electrolizadores, con la ventaja de que el hidrógeno es capaz de almacenar energía y ser transformado a electricidad al momento de ser requerido (Carl-Jochen, 2009).

El hidrógeno puede ser obtenido a partir de diferentes fuentes tanto renovables (mediante la transformación de biomasa y otros desechos agrícolas, industriales y urbanos), como no renovables (mediante la obtención a partir de hidrocarburos), además de que puede obtenerse también a partir de agua. La obtención de este elemento mediante recursos renovables puede ayudar a resolver el problema de la contaminación y la emisión de gases efecto invernadero (Turner, 2004), los cuales son generados al quemar combustibles fósiles, como el petróleo y el gas natural, que son los que sostienen la demanda energética mundial.

## **1.2. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DEL HIDRÓGENO**

El hidrógeno es el elemento más simple, ligero y basto conocido en el universo, sin embargo, no se encuentra disponible en forma de gas ( $H_2$ ) en nuestro planeta, sino formando compuestos con otros elementos (Kalinci *et al.*, 2009). Es por ello que es de gran relevancia desarrollar tecnología que permita la obtención de este gas para su aprovechamiento como combustible y acarreador energético. Actualmente, el hidrógeno se obtiene principalmente mediante procesos que contaminan el medio ambiente.

Una de las ventajas del hidrógeno es que la cantidad de energía producida durante su combustión es mayor a la liberada por otras fuentes combustibles siendo de 2.4, 2.8 y 4 veces mayor si se compara con el metano, gasolina y carbón, respectivamente, logrando generar 142 kJ/kg de energía al ser utilizado como combustible. Además, el único producto de la combustión del hidrógeno es agua (Das y Veziroglu, 2008), por lo que no contribuye a la producción de gases de efecto invernadero, lluvia ácida o al deterioro de la capa de ozono, de esta manera el hidrógeno es considerado ambientalmente limpio. Marban y Solis (2007), calcularon que la producción de hidrógeno en ese año fue de 0.1 GTONeladas, de las cuales 98% se obtuvieron a partir del reformado de combustibles fósiles.

Una de las propiedades del hidrógeno en estado gaseoso, es que se disipa rápidamente en el aire debido a su baja densidad, ya que es catorce veces más ligero que éste. La flama que produce la combustión del hidrógeno es casi invisible durante el día y se desplaza mucho más rápido que la del metano. Una flama de hidrógeno asciende en promedio 2.75 m/s, mientras que las de la gasolina o el metano lo hacen a 0.37 m/s. A diferencia de las flamas de la gasolina, la flama del hidrógeno irradia muy poca energía, lo que significa que el calor no se siente a la distancia (Hoffmann, 1981).

### **1.3. MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO**

Actualmente, la producción de hidrógeno se lleva a cabo a partir de combustibles fósiles como el gas natural y el carbón. Sin embargo, ambos combustibles tienen un límite de extracción, su utilización en la producción de hidrógeno genera gases de efecto invernadero y se requieren condiciones extremas de temperatura y presión para su producción (Bartels *et al.*, 2010).

Los métodos mas utilizados actualmente para la producción de hidrógeno son: reformación de gas natural, gasificación de carbón, oxidación parcial de hidrocarburos pesados, vía electrolítica y a partir de energía nuclear. Otro tipo de procesos por medio de los cuales puede obtenerse hidrógeno son: pirólisis, gasificación-licuefacción, a partir de agua mediante electrólisis, fotólisis, procesos termoquímicos y termólisis. Sin embargo, existen otro tipo de métodos con los cuales se obtiene hidrógeno a partir de biomasa utilizando el metabolismo microbiano a través de la fermentación o la fotosíntesis, también conocidos como producción biológica de hidrógeno. Es precisamente, en la producción biológica en la cuál se enfoca este trabajo y más específicamente en la fermentación anaerobia.

La tecnología para la producción de hidrógeno por vía biológica seguirá desarrollándose, sin embargo, existen otro tipo de tecnologías que a mediano y largo plazo (10 y 20 años respectivamente), tendrán la madurez tecnológica-económica para competir con las tecnologías ya establecidas. Entre éstas se encuentra el uso de electrólisis a partir energía solar, eólica, térmica y otras fuentes naturales como es el hidrógeno a partir de biomasa. Otras tecnologías que están en desarrollo son por

medio de radiólisis, termólisis, fotocátalisis y la producción por descarbonización a partir de hidrocarburos con captura y almacenamiento de CO<sub>2</sub> (Carl-Jochen, 2009).

Se estima que en el año 2006 se produjeron en todo el mundo alrededor de 50 millones de toneladas de H<sub>2</sub>, con una derrama de 280 mil millones de dólares y que la producción ha tenido un crecimiento anual del 10% desde entonces, principalmente mediante el reformado de metano, oxidación parcial de hidrocarburos y carbón y gasificación de biomasa; siendo la industria aeroespacial, electrónica y química (producción de amonio y metanol), las principales consumidoras de hidrógeno como materia prima (Carl-Jochen, 2009).

Actualmente la producción de hidrógeno a partir de gas natural posee el costo de producción menor, con una moderada emisión de CO<sub>2</sub> si no se implementa la captura y disposición de este gas. Estudiar y desarrollar nuevas tecnologías permitirá que la balanza cambie a favor de procesos que no generen gases efecto invernadero y la eficiencia de producción sea equivalente a la actual y en donde los costos sean menores.

## **1.4 PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO**

Aunque el principal proceso de obtención de hidrógeno no es sustentable, existen diversas formas de obtención basadas en el uso de biomasa y el aprovechamiento del metabolismo de los microorganismos para la degradación de sustratos y la obtención de hidrógeno gaseoso. Los procesos biológicos son catalizados por microorganismos en un ambiente acuoso, a presión y temperatura ambiente a diferencia de la obtención química o electroquímica.

La tecnología para la producción de hidrógeno por microorganismos está en desarrollo y se caracteriza por llevarse a cabo a pequeña escala en lugares donde la biomasa o los desechos a utilizarse como sustrato están disponibles y, con ello, disminuir los costos de transporte.

Das y Verizoglu (2001), publicaron una revisión de los diferentes métodos de producción biológica de hidrógeno, estos métodos pueden clasificarse de manera general de acuerdo al tipo de microorganismos involucrados, de la siguiente forma:

bacterias fotosintéticas, bacterias fermentativas y sistemas híbridos. En dicha revisión muestran que la mayoría de estos procesos se llevan a cabo a temperaturas entre 30 y 40 °C y a presión atmosférica; en general la producción de hidrógeno por vía fermentativa alcanza velocidades de producción mayores que las generadas por vía fotosintética.

#### 1.4.1. Producción de Hidrógeno por Vía Fermentativa

Para la obtención de hidrógeno mediante el uso de bacterias fermentativas, también conocida como fermentación oscura, se puede aprovechar el material de desecho de la industria de procesamiento de alimentos, subproductos lignocelulósicos de la industria agrícola, efluentes de aguas residuales, etc. El uso de este tipo de materia prima ha recibido especial atención, ya que se estima que puede obtenerse una cantidad de energía igual a  $1.08 \times 10^8$  GJ anualmente (Ni *et al.*, 2006). Si estos recursos tuvieran un control adecuado de recuperación para su procesamiento y obtención de hidrógeno podrían convertirse en una de las principales fuentes de energía en el futuro.

La producción de hidrógeno mediante fermentación oscura tiene la ventaja de tener velocidades rápidas de degradación de materia orgánica y su operación es sencilla en comparación con la producción mediante organismos fotosintéticos (Sinha y Pandey, 2011). Además, pueden emplearse diferentes desechos orgánicos, aguas residuales y otros desperdicios como sustrato, que los microorganismos pueden utilizar para su mantenimiento y, en consecuencia, generar hidrógeno del metabolismo microbiano.

Los microorganismos involucrados en la producción de hidrógeno por vía fermentativa incluyen a muchas especies bacterianas principalmente de los géneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Bacillus* y *Clostridium*. Además, los reportes acerca de consorcios y co-cultivos también han sido ampliamente explorados en la literatura debido a que es más sencillo llevarlo a una fase piloto y posteriormente a una planta de tratamiento de agua donde sería complicado mantener las condiciones de

esterilidad requeridas si se usaran cultivos puros (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2008).

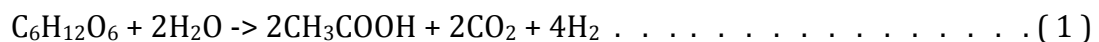
#### 1.4.2. Vías Metabólicas Involucradas

Los microorganismos han utilizado al hidrógeno como fuente primaria de energía por miles de años y, en ese tiempo, resolvieron la manera de convertir hidrógeno a energía a través del uso de enzimas. En estos procesos metabólicos intervienen las nitrogenasas e hidrogenasas, las cuales, regulan la producción de hidrógeno que está ligada a la utilización de productos de las reacciones fotosintéticas, y que en microorganismos eucariotes y procariotes fotosintéticos generan compuestos reductores a partir de agua, y de manera similar que en los microorganismos fermentativos (Meher y Das, 2008).

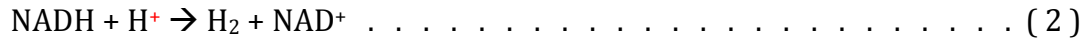
La fermentación oscura se lleva a cabo en condiciones donde no hay presencia de oxígeno y por lo tanto, éste no actúa como aceptor de electrones. Las bacterias que crecen en este entorno y utilizan compuestos orgánicos para obtener energía degradan los substratos y obtienen electrones.

Para los microorganismos heterotróficos que producen hidrógeno, el crecimiento anaerobio presenta problemas particulares en cuanto a la disposición del flujo de electrones a partir de las reacciones de oxidación. Esto se debe a que las necesidades energéticas para la actividad biosintética solamente son satisfechas con una gran cantidad de compuestos orgánicos que sirven como fuente de energía. Debido a este problema, los microorganismos han desarrollado diferentes vías metabólicas en las cuales se ve involucrado el hidrógeno ya sea como producto (fermentación ácida mixta), o como intermediario.

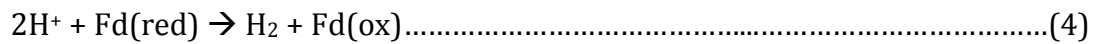
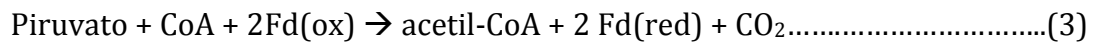
La ecuación general de la producción de hidrógeno por vía fermentativa en la cual se toma como único subproducto al acetato puede ilustrarse con la siguiente fórmula química:



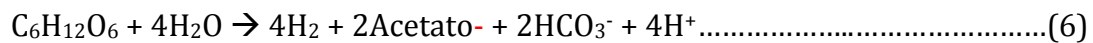
A continuación se ejemplificarán las reacciones de la vía metabólica del NADH en la cual el hidrógeno está involucrado en la reoxidación de acuerdo a la siguiente ecuación:



El NADH de la ecuación 2, se produce durante la glicolisis en donde se realiza la fermentación de la glucosa a piruvato. El rompimiento del piruvato es catalizado dependiendo del tipo de microorganismos por las enzimas Piruvato Formiato Liasa ó Ferredoxina oxido reductasa para la producción de acetil CoA y ATP, lo cual fue una consecuencia natural donde la fermentación fue optimizada para la producción de biomasa y no para producir hidrógeno, además de los diferentes productos involucrados (Hallenbeck y Benemann, 2002). En la siguiente ecuación se puede observar la oxidación de piruvato a acetil-CoA y su oxidación por acción de la ferredoxina presente en la enzima hidrogenasa (Das y Veziroglu, 2008):



La formación de los productos obedece a las condiciones ambientales en las cuales los microorganismos crecen. Productos como etanol, butanol y lactato, contienen hidrógeno que todavía no se ha liberado; así, para maximizar la cantidad de hidrógeno, el metabolismo microbiano debe enfocarse hacía la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), en especial la producción de acetato con lo cual se generan 4 moles de H<sub>2</sub> (Bedoya et al., 2008). A continuación se presentan las reacciones de producción de hidrógeno junto con acetato o butirato:



La generación de una mayor concentración de ciertos productos como los ácidos grasos depende de las condiciones ambientales del proceso a las que se encuentren sujetos los microorganismos y pueden ser el pH, tiempo de retención hidráulico (TRH) y presión parcial de hidrógeno, entre otros. Estos factores pueden



ser regulados directamente en los sistemas de producción de hidrógeno, también conocidos como reactores o fermentadores, los cuales son utilizados para diversos propósitos en la industria.

#### 1.4.3. Sistemas de Producción de Hidrógeno

Actualmente, la fermentación anaerobia es aplicada a nivel industrial en plantas de tratamiento para la remoción de los contaminantes en agua mediante el uso de reactores, en donde los microorganismos activos son los principales involucrados en la eliminación de partículas y materia orgánica.

La clave para la aplicación de la fermentación anaerobia en reactores, es el incremento de la eficiencia mediante el desacoplamiento del tiempo de retención hidráulico del tiempo de retención de sólidos en el reactor, con ello, se propicia el incremento en la concentración de biomasa en el sistema y a su vez, se puede aumentar la carga de entrada de sustrato.

Actualmente existen diferentes diseños que promueven la retención de biomasa en el sistema. De acuerdo con lo reportado por Show *et al.* (2010), la formación de gránulos incrementa substancialmente la retención de biomasa y a su vez se incrementa proporcionalmente la velocidad de producción de hidrógeno. Quizá el sistema de tratamiento con retención de biomasa más popular es el reactor de flujo ascendente de lecho de lodo granular (UASB, por sus siglas en Inglés), el cual maneja altas cargas orgánicas y bajos tiempos de retención hidráulicos (Wang *et al.*, 2004).

Estos sistemas de tratamiento basados en el uso de gránulos son ampliamente utilizados para la producción de hidrógeno ya que son capaces de mejorar la operación en el tratamiento de aguas residuales manteniendo altas concentraciones de biomasa y altas velocidades de carga orgánica, en consecuencia el volumen de los reactores puede verse reducido (Zhang *et al.*, 2008a).

Los retos que tiene la producción de hidrógeno por vía fermentativa son la baja eficiencia de conversión y la producción inestable. Uno de los factores importantes relacionados con la eficiencia de conversión tiene que ver directamente con el diseño y los parámetros de operación de los reactores. Mejorando el diseño del reactor y

optimizando los parámetros de operación como el pH, el tiempo de retención hidráulico y la temperatura se podrá mejorar el proceso de producción de hidrógeno (Meher y Das, 2008).

### **1.5 TEORÍAS SOBRE LA FORMACIÓN DE GRÁNULOS**

La granulación es un proceso de agregación célula a célula en donde no se necesita un acarreador, pero sí condiciones específicas de operación para propiciar y mejorar la agregación. Los gránulos presentan un gran potencial y capacidad para remover contaminantes del agua debido a su alta velocidad de sedimentación, alta concentración de biomasa y la habilidad para soportar altas cargas orgánicas y en consecuencia, una reducción en el volumen del reactor (Schmidt y Ahring, 1996; Tay et al., 2001).

En 1976 se observó por primera vez la formación de gránulos en una planta piloto de una fábrica de azúcar en Breda, Holanda (Lettinga *et al.*, 1977). Desde entonces se ha visto como el aumento en la concentración de biomasa a través de la formación de gránulos mejora el rendimiento del proceso y al mismo tiempo, se ha intentado explicar que fenómenos están involucrados en la granulación.

La formación de gránulos está influenciada por diferentes factores físicos, químicos y biológicos que no pueden considerarse de forma individual ya que todos intervienen en el proceso. Para entender mejor el mecanismo y como se lleva a cabo la agregación de microorganismos hasta la formación de gránulos se han desarrollado diversos modelos que han intentado explicar este fenómeno (Hulshoff *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2003). Para facilitar la explicación de este proceso, se ha agrupado en cuatro pasos:

En el primer paso se lleva a cabo un movimiento físico que permite el contacto entre células formando un núcleo. En este proceso están involucrados fenómenos físicos como son las fuerzas hidrodinámicas, de difusión, gravitatorias, entre otras. El segundo paso se da al juntarse dos células, los grupos funcionales en su superficie interactúan mediante fuerzas de atracción (fuerzas de van der Waals, dipolo dipolo, hidrofobicidad, etc.), que mantienen la estabilidad y unión (Hulshoff *et al.*, 2004).

### 1.5.1. Papel de los polímeros extracelulares.

En la tercera etapa se producen polímeros extracelulares que actúan como pegamento natural y permiten se mantenga la unión entre los microorganismos. Además, se desarrolla una estructura organizada de las células que facilita la interacción debido a un cambio metabólico e inducción de genes (Hulshoff *et al.*, 2004).

Los polímeros extra celulares (PEC) tienen un papel importante en el mantenimiento de la estructura y función de los flóculos (D'Abzac *et al.*, 2010). Los PEC tienen influencia sobre las propiedades fisicoquímicas de los agregados microbianos incluyendo estructura, carga superficial, floculación, propiedades de adsorción, etc. y aceleran la formación de agregados microbianos al mantener a las células unidas (Liu *et al.*, 2004).

Los polímeros extracelulares han sido detectados en gránulos aerobios y anaerobios formando una matriz tridimensional en donde bacterias u otras partículas están embebidas (Fang, 2000). Estos polímeros son producidos por los microorganismos durante el crecimiento y contienen diferentes proporciones de proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, sustancias tipo húmicas, lípidos y heteropolímeros como glicoproteínas (Frolund, 1996).

En el caso de los polisacáridos, estos son los únicos componentes sintetizados extracelularmente mientras que los demás compuestos son liberados ya sea por excreción o por rompimiento celular (Mahmoud *et al.*, 2003).

De manera general los factores ambientales que tienen influencia sobre la producción y composición de los polímeros extracelulares se pueden clasificar en dos grupos, en el primero intervienen cambios en las condiciones ambientales que ocasionan, a su vez, cambios en la comunidad microbiana; y en segundo lugar, las características de la comunidad microbiana y su respuesta a los cambios ambientales (Liu *et al.*, 2004).

Una vez que se tienen agregados celulares estables se entra a una cuarta fase, donde se forma una estructura en tres dimensiones la cual esta sujeta a fuerzas de corte hidrodinámicas, a la interacción entre gránulos y a la velocidad de carga del sustrato.

Los estudios sobre la granulación se han llevado a cabo principalmente en reactores UASB con consorcios metanogénicos, en los cuales, están involucradas Arqueas filamentosas que propician el crecimiento y la estabilidad de los gránulos (Morgan *et al.*, 1991). Sin embargo, se han realizado pocos estudios en la formación de gránulos productores de hidrógeno en donde a diferencia de los gránulos metanogénicos no hay presencia de arqueobacterias filamentosas. A pesar de tener un alto potencial para su aplicación en la industria, los gránulos presentan la desventaja de que su formación puede tardar meses y mientras estos se forman no son efectivos para la remoción de contaminantes o en este caso, para la producción de hidrógeno (Liu *et al.*, 2004).

Debido a esta circunstancia se han realizado estudios para acelerar la granulación. Liang *et al.*, (2010) utilizaron un reactor AnSBR (Anaerobic Sequencing Batch Reactor, por sus siglas en Inglés) para el desarrollo de gránulos productores de hidrógeno, encontrando un desarrollo granular en un tiempo de diez días al utilizar un pretratamiento ácido durante 24 horas antes de la puesta en marcha del reactor. Los gránulos fueron estables durante todo el desarrollo experimental que tuvo una duración de 60 días y alcanzó un rendimiento de hidrógeno promedio de 1.36 mol de H<sub>2</sub>/mol Glucosa.

### 1.5.2. Inducción de la formación de agregados microbianos

Como se mencionó anteriormente los gránulos se han utilizado extensamente en reactores UASB (Mahmoud *et al.*, 2003). Los reactores completamente agitados continuos con biomasa suspendida como los CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor, por sus siglas en Inglés), son también ampliamente utilizados para la producción de hidrógeno (Kataoka *et al.*, 1997). Este tipo de sistemas permiten una alta eficiencia en la transferencia de masa debido a un buen mezclado, sin embargo, presenta como

limitante bajas concentraciones y pobre retención de biomasa cuando se manejan bajos tiempos de retención hidráulicos (Lee *et al.*, 2006).

En los últimos años se ha visto la formación de gránulos en reactores CSTR y AnSBR mediante el pretratamiento a pH ácido del inóculo (Zhang *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2010), y se ha buscado optimizar el tiempo de formación así como analizar las características de este tipo de gránulos (Zhang *et al.*, 2008a; Fang *et al.*, 2002). Zhang *et al.*, (2006), realizaron la inducción de la granulación de un lodo productor de hidrógeno mediante su incubación a pH 2 durante 24 horas, observando que la agregación microbiana posterior a la incubación ácida y el desarrollo de gránulos se llevó a cabo a las 114 horas utilizando un CSTR.

En otro estudio realizado también por Zhang *et al.*, (2008b), compararon el aumento en la concentración de biomasa mediante la inducción en la formación de gránulos y biopelículas en reactores CSTR y AFBR (Anaerobic Fluidized Bed Reactor, por sus siglas en Inglés). En este estudio el mayor rendimiento se obtuvo con la formación de gránulos en el reactor AFBR, encontrando que los gránulos comenzaron a perder compactación cuando la agitación superó las 280 rpm en el reactor CSTR, lo que provocó un lavado de la biomasa.

Procesos en donde se utilizan materiales de soporte, como el citado anteriormente, permiten el mantenimiento de altas concentraciones de biomasa en el reactor, sin embargo, estos materiales ocupan un espacio considerable en el tanque, lo cual reduce el volumen efectivo. Además, estos materiales necesitan ser reemplazados periódicamente debido al desgaste, lo cual provoca que el costo del material pueda llegar a ser un aspecto muy importante al momento de elegir este tipo de procesos (Zhang *et al.*, 2008b).

Un aspecto poco estudiado en la formación de gránulos es el uso de agentes químicos (naturales o sintéticos), que propicien y aceleren la agrupación de bacterias. En algunos trabajos publicados se ha recurrido al uso de carbón activado (Lee *et al.*, 2004), o un polímero sintético (Wang *et al.*, 2004), logrando mejorar las características de los gránulos, disminuyendo el tiempo de arranque y el incremento en la capacidad de remoción. La mayor parte de los estudios que han utilizado algún

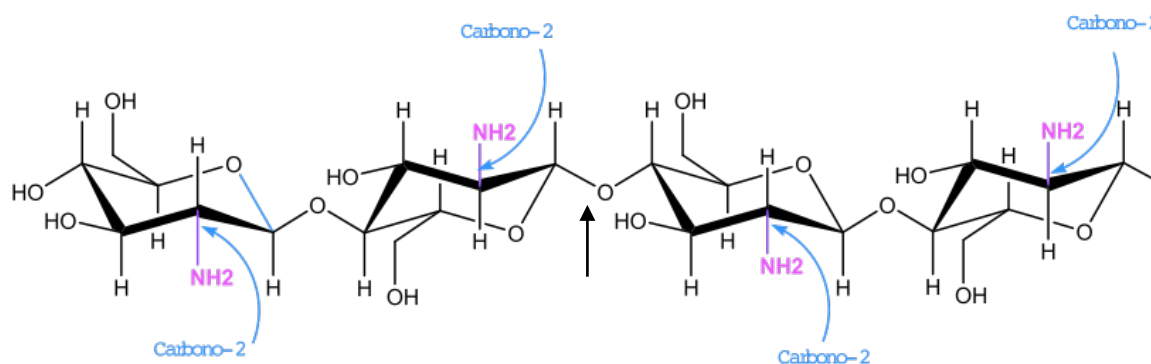
tipo de polímero para la inducción de la granulación, han sido desarrollados en reactores UASB con cultivos metanogénicos, siendo la poliacrilamida el coagulante más utilizado (El-Mamouni *et al.*, 1998; Uyanik *et al.*, 2002; Jeong *et al.*, 2005; Bhunia y Ghangrekar, 2008).

## 1.6. EL QUITOSANO

En este trabajo se propuso utilizar el quitosano como un polímero natural que ayudara en la formación de agregados celulares. A continuación se detallan las características químicas que hacen del quitosano un compuesto de interés en el campo de la producción de hidrógeno mediante la fermentación oscura.

### 1.6.1. Propiedades químicas del quitosano

El quitosano es un polímero formado por unidades de N-acetil glucosamina y glucosamina unidas por enlaces glicosídicos  $\beta(1-4)$ . Es insoluble en solventes orgánicos y en soluciones alcalinas. Sin embargo es soluble en soluciones diluidas de ácidos orgánicos e inorgánicos como el clorhídrico, nítrico, perclórico y acético. Al solubilizarse en ácidos débiles se forman sales solubles en agua, que pueden aprovecharse para propósitos industriales o farmacéuticos (Peniche, 2006).



**Figura 1.1.** Extremo no reductor de una molécula de quitosano, formada exclusivamente por unidades de glucosamina eslabonadas por enlaces glicosídicos  $\beta(1-4)$ .

A pH ácido el quitosano actúa como un polielectrolito, con una alta densidad de cargas positivas, debido a la protonación del grupo amino de cada unidad de glucosamina, consecuentemente tiene la capacidad de interactuar con moléculas de carga contraria, como pueden ser péptidos, aniones y ácidos nucleicos. También puede adherirse a polímeros o estructuras naturales como el cabello, la lana, mucopolisacáridos, proteínas y células (Peniche, 2006). Debido a estas propiedades el quitosano puede interactuar también con las células bacterianas presentes en sistemas de tratamiento de agua, neutralizando las cargas negativas de la membrana, desestabilizándolas. Este fenómeno fisicoquímico es crucial para que las células puedan acercarse lo suficiente para crear una interacción entre dos o más células logrando la formación de flóculos y gránulos.

El quitosano es capaz de interactuar con metales de transición por quelación, intercambio iónico o enlaces covalentes coordinados, produciendo varios compuestos coloridos. Además puede formar complejos con iones metálicos, por lo que puede utilizarse en el tratamiento de efluentes industriales.

En algunos trabajos como los desarrollados por El-mamouni et al., (1998) y por Cheng et al., (2005) quienes utilizan el quitosano como un polímero capaz de remover la materia orgánica del agua con la intención de ser aplicado como coagulante en las plantas de tratamiento de agua utilizando consorcios metanogénicos. La concentraciones utilizadas fueron de 25 mg/gSV y 150 mg/L respectivamente.

## **1.7. JUSTIFICACIÓN**

El hidrógeno puede obtenerse mediante procesos biológicos como la fermentación oscura para ser utilizado como combustible a partir de residuos agrícolas o del tratamiento de aguas residuales. Los microorganismos que llevan a cabo este proceso son capaces de formar consorcios, el estudio de la formación de estas relaciones para microorganismos productores de hidrógeno en reactores completamente agitados es limitado, además, el uso de sustancias que aceleren su formación no ha sido suficientemente explorado. En este sentido, el uso quitosano puede acelerar la formación de gránulos productores de hidrógeno.

## **1.8. HIPÓTESIS**

El quitosano es un polímero orgánico que posee cargas positivas, lo cuál al estar en contacto con células, puede generar una disminución en las fuerzas electroestáticas que impiden el acercamiento entre éstas, propiciando la aglomeración y con ello aumentar la velocidad de formación de gránulos. Si se agrega un agente coagulante como el quitosano, entonces, se acelerará la formación de gránulos lo que incrementará la producción de hidrógeno.



## **1.9. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto del quitosano sobre la formación de gránulos productores de hidrógeno en un sistema continuo completamente agitado.

### **1.9.1. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar el efecto del quitosano sobre la de formación de gránulos.
- Llevar a cabo un estudio de la composición de los polímeros extracelulares involucrados en la agregación bacteriana.
- Realizar la caracterización de los gránulos formados y establecer la producción máxima de hidrógeno.

# Capítulo II

## 2. Metodología

### 2.1. PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN UN CULTIVO EN LOTE

#### 2.1.1. Inóculo.

El inóculo utilizado para la prueba de actividad en lote y la prueba de jarras, se obtuvo a partir del efluente de un reactor CSTR productor de hidrógeno, alimentado con hidrolizado ácido de paja de avena, el cual se centrifugó a 10000 rpm durante 12 min. Para tener un estimado de la cantidad de biomasa presente en el lodo concentrado, se realizó la determinación de sólidos volátiles (SV). Posteriormente, la biomasa se guardó en refrigeración a 4°C hasta su uso. La concentración final de sólidos volátiles en los experimentos en lote y prueba de jarras fue de 4.5 g SV/L y 2.5 g SV/L respectivamente.

### 2.1.2. Medio de cultivo.

El sustrato utilizado en la evaluación de la actividad de producción de hidrógeno en lote y el desarrollo del cultivo en un reactor CSTR fue glucosa a una concentración de 20 g/L suplementado con medio sintético, el cual contenía los minerales descritos en la Tabla 2.1. Además, se agregaron 200 mg/L de extracto de levadura.

**Tabla 2.1.** Concentración de las diferentes sales utilizadas para preparar el medio mineral adicionado a los diferentes cultivos.

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>
NH <sub>4</sub> Cl	2000
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	500
MgCl <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O	100
(FeSO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	17.6
ZnCl <sub>2</sub>	1
MnCl 4H <sub>2</sub> O	17.56
CuSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	5
CoSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	2.16
Mo <sub>2</sub> O <sub>24</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> 4H <sub>2</sub> O	9.12
NiCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.08
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	0.011
BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	0.1

### 2.1.3. Cultivo en lote.

En este experimento se evaluó la producción de hidrógeno por un consorcio microbiano que fue obtenido a partir del reactor en continuo descrito anteriormente, utilizando como sustrato glucosa a una concentración de 25 g DQO/L. El experimento se realizó en frascos serológicos con un volumen de 120 ml, dejando 40 ml de espacio de cabeza y manteniendo una temperatura de  $37 \pm 2$  °C. El pH inicial se ajustó a 7.5 con NaOH 1 M. El gas producido se determinó mediante el empleo de un equipo cuyo mecanismo consistía en el desplazamiento de agua por el gas producido y la medición de éste con una escala graduada. Cada experimento se realizó por duplicado manteniendo las botellas en agitación a 110 rpm.

## **2.2. CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE QUITOSANO MEDIANTE LA PRUEBA DE JARRAS**

### **2.2.1. Agente coagulante.**

Se utilizó quitosano ya que es un polímero natural cuyo punto de carga cero, según lo reportado por Čakara *et al.*, 2009, se encuentra a un pH entre 8 y 9 por lo que al pH del cultivo (5.5) mantendrá cargas positivas necesarias para desestabilizar a las células y permitir su interacción. Se preparó una solución de quitosano a una concentración de 20 g/L en ácido acético al 2%, a partir de la cual se tomaron alícuotas para su uso en la prueba de jarras.

### **2.2.2. Prueba de jarras.**

Para elegir la concentración a la cual se forma la mayor cantidad de flóculos con la menor concentración de quitosano utilizado, se realizó una prueba de jarras (PB-700, Phipps and Birds Jar Test). Como inóculo se utilizó la biomasa refrigerada mencionada en la sección 2.1.1. La concentración inicial de sólidos volátiles a la cual se hicieron las pruebas fue de 2.5 g SV/L y la concentración final de quitosano en las pruebas fue de 5, 10, 25, 50, 100 y 150 mg de quitosano/L/g SV de acuerdo con lo reportado por El-mamouni *et al.*,(1998) como concentración base.

La suspensión de biomasa se ajustó a un pH de 5.5 con ácido clorhídrico 0.1 M y posteriormente se colocaron 1.3 L de esta suspensión en diferentes jarras de plástico las cuales tenían un volumen de 2 L y contaban con una propela que permitía la agitación de la suspensión. Para cada uno de los experimentos la agitación se mantuvo a 180 rpm antes de agregar quitosano y hasta un minuto después, para posteriormente, reducir la agitación a 30 rpm durante dos minutos para facilitar el proceso de floculación.

Posteriormente, la agitación se detuvo manteniendo así el proceso de floculación durante 30 minutos en los cuales se tomaron muestras a diferentes tiempos para evaluar la turbidez y los sólidos sedimentables (SS). Una vez detenida la agitación las soluciones se dejaron en reposo durante cierto tiempo para evaluar la

turbidez, el cual es un parámetro que permite evaluar la disminución de biomasa y la materia orgánica en suspensión registrando de forma indirecta la formación de flóculos . Para este fin se tomaron muestras a 1, 10, 20 y 30 minutos de reposo evaluando

## **2.3. PRODUCCIÓN DE AGREGADOS MICROBIANOS EN UN REACTOR**

### **CSTR**

#### **2.3.1. Arranque y operación del reactor**

Para cada uno de los experimentos descritos en este apartado se trabajó con un reactor completamente agitado, equipado con el sistema de control ADI 1030 (Applikon Biotechnology, Schiedam, Holanda). El volumen total del reactor fue de 1.3 L, teniendo un volumen de trabajo de 0.9 L. Como inóculo se utilizó lodo granular obtenido a partir de un reactor UASB que trata efluentes de una fábrica de confitería en San Luis Potosí, SLP., y que contenía alrededor de 8 g SSV/L. El reactor fue inoculado con 4.5 g SSV/L, el cual previamente había sido sometido a un tratamiento térmico (1 h a temperatura de ebullición), para la inactivación de los microorganismos metanógenos. El pH inicial fue de 7.5 y durante el cultivo en lote y continuo se controló a 5.5 mediante la adición de una solución de NaOH 2 M. Como fuente de carbono y energía se utilizó glucosa a una concentración de 20 g/L, 200 mg/L de extracto de levadura y 100 ml del medio mineral previamente descrito, por cada litro utilizado; el volumen final fue ajustado con agua destilada. La temperatura de trabajo para todos los experimentos fue de 37°C manteniendo una velocidad de agitación de 250 rpm mediante el empleo de unas turbinas tipo Rushton antes de agregar quitosano. La velocidad de agitación se modificó después de agregar el quitosano posterior al uso de quitosano de acuerdo a lo descrito en la Tabla 2.2.

El tiempo de arranque y operación en lote fue en promedio de 18 h, tiempo al que se comenzó a alimentar el reactor para iniciar el sistema en continuo, manteniendo para cada uno de los reactores un TRH de 8 h y una carga orgánica de 60 g/L/d. La producción de gas se midió mediante el uso de un aparato de

desplazamiento de agua acidificada (pH 2). Cada uno de los reactores se mantuvo en alimentación constante durante mínimo 5 TRH y una vez que la velocidad de producción de gas se mantuvo relativamente estable, se procedió a agregar quitosano para evaluar la formación de gránulos.

### 2.3.2. Pruebas de granulación en continuo

Estas pruebas se realizaron con el objetivo de inducir la granulación de biomasa en un reactor CSTR utilizando quitosano como coagulante. Se realizaron cuatro experimentos con las siguientes características en la operación: temperatura 37 °C, pH 5.5, 250 rpm, TRH 8 h y una carga orgánica de 60 g/L/d. Para el experimento I se utilizó lodo granular disgregado mientras que para los experimentos II, III y IV, el lodo no fue disgregado haciendo pasar repetidamente los gránulos por el orificio de una jeringa de 10 mL. Las características del inóculo, duración total de cada uno de los experimentos, así como el régimen de la agitación se describen en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2.** Condiciones para cada uno de los experimentos realizados para la formación de agregados microbianos mediante el uso de quitosano en un reactor completamente agitado.

Experimento	Lodo granular	Duración Total del experimento (h)	Tiempo al que se agregó quitosano (h)	Agitación (rpm)*			
				Rápida (durante 1 min)	Lenta (durante 5 min)	Paro (min)	Mantenimiento
I	Disgregado	1050	910	250	30	NA**	80
II	Sin Disgregar	135	70	250	40	NA	120
III	Sin Disgregar	233	80	250	40	20	80
IV	Sin Disgregar	307	80	250	40	30	120

\*Las etapas de agitación rápida, lenta, paro y mantenimiento son secuenciales e iniciaron justo en el momento que se agregó el quitosano al reactor.

\*\*NA: No aplica para estos experimentos.

A cada uno de los experimentos en continuo se les agregó quitosano a la concentración determinada en la prueba de jarras. Posteriormente se controló la agitación durante un minuto a 250 rpm (agitación rápida), para propiciar la mezcla del coagulante en cada uno de los experimentos y, después de este tiempo, la agitación se redujo durante 5 minutos (agitación lenta). La reducción de la velocidad fue para facilitar la agregación y formación de flóculos. Para los experimentos III y IV después del periodo de agitación lenta, ésta se detuvo (paro), para fomentar el crecimiento de los flóculos. Finalmente, la agitación fue reiniciada (mantenimiento) a las velocidades de agitación indicadas en la Tabla 2.2.

Para estos experimentos se realizaron diversas determinaciones como fueron: tamaño de partícula (granulometría), índice volumétrico de sólidos, velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH), observación microscópica de los agregados, ácidos grasos volátiles, producción y caracterización de polímeros extracelulares (proteínas, carbohidratos y ácido urónico). La producción de gas durante el tratamiento fue medido utilizando un sistema de desplazamiento de líquido llenado con agua a pH 2.

### 2.3.3. Determinación del tamaño de partícula

Para evaluar el tamaño de los agregados formados se tomaron 15 mL de muestra directamente del reactor con una manguera adaptada a una jeringa. La muestra se tomó utilizando solamente la parte de la manguera de tal forma que los agregados formados no sufrieran un daño al pasar por el orificio de la jeringa. Posteriormente cada muestra se colocó en una caja Petri. La muestra ya lista fue colocada para su observación en un microscopio estereoscópico con un aumento de 1.25x para todas las muestras. Se tomaron fotografías de diferentes campos de la placa controlando que la iluminación fuera preferentemente horizontal para crear un contraste entre las partículas suspendidas y el fondo de la placa.

Posteriormente las imágenes se analizaron mediante el software ImageJ y, para ello, cada una de las fotografías obtenidas fue transformada a 8 bits de color y se les aplicó un filtro Gaussian Blur (1 - 2 puntos), con lo cual se disminuyó la interferencia causada por el propio sensor de la cámara. Para evaluar el tamaño de las partículas en



la fotografía se ajustó el umbral (Treshold), para permitir que el software identificara el área de las partículas. Antes de comenzar el análisis, el software fue calibrado utilizando una escala digitalizada con intervalos conocidos, obteniendo así el número de pixeles entre las dos marcas correspondientes.

#### 2.3.4. Observaciones Microscópicas

Además, se realizó la observación de la estructura y composición de los gránulos mediante microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en Inglés). Las muestras fueron preparadas de acuerdo al método de Zhang et al. (2008). Con esta técnica se logró analizar el tamaño y la morfología superficial de los flóculos formados.

#### 2.3.5. Extracción de Polímeros Extracelulares.

La cuantificación de la cantidad de polímeros extracelulares producidos por los microorganismos se llevó a cabo utilizando el método de formaldehído-NaOH (1N, a 4 °C por 3 h) reportado por Liu y Fang (2002). Los polímeros extracelulares se extrajeron a partir de 10 mL de lodo centrifugado a 10000 rpm para separar a las células del sobrenadante, se colectaron ambos residuos para determinar polímeros anclados y disueltos. Después de centrifugar se colectaron los gránulos resuspendiéndolos con 10 mL de agua destilada y agregando 0.06 mL de formaldehído (36.5%), manteniendo esta suspensión a 4 °C en reposo por 1 hora. Posteriormente, se agregaron 4 mL de NaOH 1N manteniendo la suspensión de gránulos a 4 °C por 3 horas sin agitación. Al término de este periodo se realizó una centrifugación a 13000 rpm por 20 min y el sobrenadante se filtró con una membrana de 0.2 µm para evitar la presencia de células. El líquido filtrado se purificó con una membrana de diálisis de 3500 Daltones a 4 °C durante 24 h para remover los residuos de los químicos utilizados en la extracción, finalmente se liofilizó a -50 °C por 48 h.

##### 2.3.5.1. Análisis químico de los Polímeros extracelulares.

La cantidad total de polímeros extraídos fue determinada mediante el peso de los sólidos después de ser liofilizado. El contenido de carbohidratos fue determinado mediante el método de carbohidratos totales propuesto por Dubois (1968), utilizando

glucosa como estándar. Las proteínas se determinaron por el método de Lowry modificado por Frolund et al., (1995); también se determinó el contenido de ácido urónico, éste último mediante el método del ácido m-hidroxidifenil sulfúrico modificado por Kintner y van Buren (1982), utilizando ácido glucurónico como estándar.

#### **2.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

El hidrógeno y CO<sub>2</sub> fueron analizados mediante cromatografía de gases empleando una jeringa Pressure-Lok (Valco Instruments, Houston, USA) de 1 mL comparando con un gas estándar de alta pureza (0.5 mL). El cromatógrafo de gases (GC 6890N, Agilent Technology, Waldbronn, Germany), estaba equipado con un detector de conductividad térmica. Las temperaturas del puerto de inyección, horno y el detector fueron de 250, 60 y 250 °C, respectivamente. El gas acarreador fue nitrógeno con una velocidad de flujo de 12 mL/min.

Determinación de turbidez y sólidos sedimentables. La turbidez se determinó mediante un turbidímetro (2100N Hach Turbidimeter), en unidades de turbidez nefelométricas (NTU, por sus siglas en ingles). Además, se realizó la determinación de sólidos sedimentables mediante el empleo de conos Imhoff utilizando un volumen de muestra de 1 L, correspondiente a la capacidad de cada cono en donde se agregaron cada una de las suspensiones dejándolas sedimentar durante 1 hora de acuerdo con los métodos estándar (APHA, 1998).

Determinación de Sólidos Volátiles. para lo cual se pesaron 5 g de muestra en cápsulas de porcelana previamente puestas a peso constante en una mufla a 550°C. Se realizó la evaluación de sólidos volátiles a dos muestras, cada una por triplicado de acuerdo a los métodos estándar (APHA, 1998)

Análisis de ácidos grasos volátiles (AGV). La determinación de AGV se realizó utilizando un sistema de electroforesis capilar (Agilent 1600A, Waldbronn, Germany). Los ácidos grasos volátiles se determinaron de múltiples muestras del seno del líquido de acuerdo al procedimiento reportado por Davila-Vazquez et al.,(2008). Para

disminuir la actividad microbiana de las muestras se adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{HgCl}_2$  (16 g/L) y se guardaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su análisis

Determinación de DQO. Las determinaciones de demanda química de oxígeno (DQO) fue determinada mediante el procedimiento descrito en los métodos estándar (APHA, 1998).

# Capítulo 3

## Resultados y Discusión

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

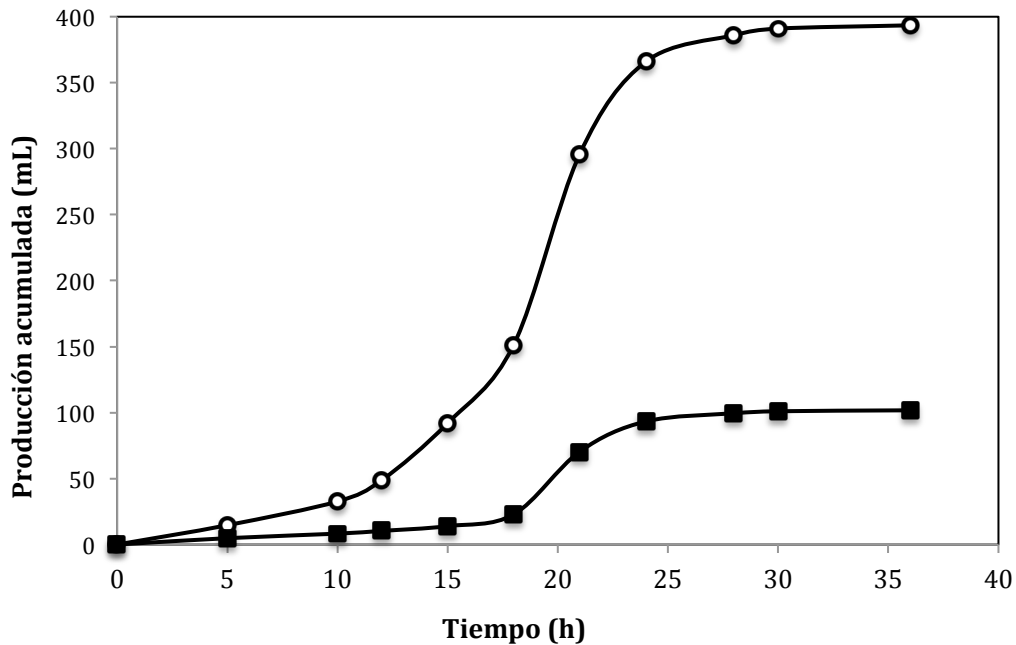
En la primera parte del trabajo experimental se determinó la actividad de producción de hidrógeno de la biomasa que se obtuvo a partir de un reactor CSTR alimentado con hidrolizados de paja de avena. Además, se realizó la determinación de sólidos volátiles de esta biomasa con el fin de determinar con precisión la concentración de biomasa que se tiene en un reactor en continuo. Posteriormente, se preparó la solución de quitosano necesaria para realizar la floculación en la prueba de jarras, en donde se realizó la determinación de turbidez, pH y sólidos sedimentables, determinándose la concentración óptima de quitosano para su posterior uso en el estudio de la formación de agregados microbianos.

La segunda parte del trabajo experimental consistió en montar un reactor completamente agitado con las condiciones necesarias para la producción de hidrógeno usando un consorcio microbiano previamente tratado para eliminar la presencia de arqueas productoras de metano. Una vez que se estableció el sistema se procedió a inducir la formación de agregados microbianos mediante el uso de quitosano a las concentraciones previamente establecidas en la prueba de jarras. Con estos datos se pudo realizar una evaluación del posible uso del quitosano como un polímero natural utilizado en el área de la floculación para el tratamiento de aguas residuales y su efecto en la producción de agregados microbianos productores de hidrógeno. A continuación se presentan en detalle los resultados obtenidos.

### **3.1. PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN UN CULTIVO EN LOTE**

Para llevar a cabo la prueba de jarras se obtuvo biomasa a partir de un reactor completamente agitado, evaluando primeramente la velocidad de producción de hidrógeno mediante el empleo de un cultivo en lote, lo que permitió conocer la capacidad del consorcio microbiano para producir hidrógeno. Se usó glucosa como fuente de carbono y energía y el experimento tuvo una duración de 36 horas en las que no se detectó la presencia de  $\text{CH}_4$ .

Como se observa en la Figura 3.1 la fase de retardo duró 16.23 horas después de la cual comenzó la producción de gas, alcanzando un volumen de 400 mL con un contenido de 24.4% de hidrógeno, teniendo en promedio 97 mL. La velocidad de producción máxima fue de 17.08 mL  $\text{H}_2/\text{h}$ , lo cual equivale a una actividad específica de producción de hidrógeno de 14.37 mL  $\text{H}_2/\text{g SV/d}$ . En comparación con trabajos realizados por Davila-Vázquez (2008), al utilizar glucosa como sustrato, reporta para concentraciones de 25 g DQO/L y un pH inicial de 7.5, un volumen de producción de hidrógeno alrededor de 173 ml, siendo en comparación con este trabajo el doble de la producción presentada en este estudio.



**Figura 3.1.** Producción acumulada de hidrógeno (■) y gas (○) durante 36 h de incubación a 37 °C con un pH inicial de 7.5, en un cultivo en lote que contenía glucosa a una concentración de 25 g DQO/L como principal fuente de carbono.

### 3.2. PRUEBA DE JARRAS

Con el objetivo de conocer la concentración óptima de quitosano para inducir la floculación de la biomasa en suspensión, se llevó a cabo la prueba de jarras utilizando 6 concentraciones de floculante de la siguiente manera: 5, 10, 25, 50, 100 y 150 mg de quitosano/L/g SV, mas un testigo al cual no se le adicionó quitosano.

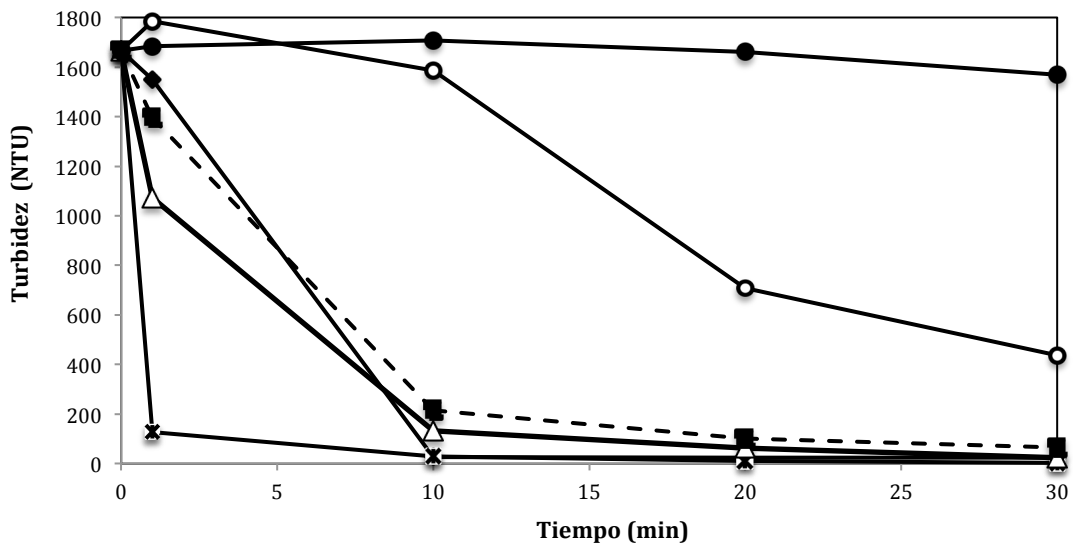
Los resultados presentados en la Figura 3.2 muestran que el quitosano puede ser utilizado de manera eficiente como un agente floculante a bajas concentraciones. La suspensión de biomasa que se utilizó mantuvo una turbidez inicial de 1665 NTU que fue determinada antes de agregar el quitosano, siguiendo el mismo procedimiento posteriormente para cada una de las muestras.

Como se observa en la Figura 3.2 la turbidez de la suspensión disminuye inmediatamente después de haber agregado quitosano, siendo la concentración de 10 mg quitosano/L/g SV la que logró reducir la turbidez de 1665 a 128 NTU un minuto

después de detener la agitación. De manera general, aquellas concentraciones por debajo de 100 mg quitosano/L/g SV redujeron la turbidez hasta 20 NTU o menos en un tiempo de 30 minutos después de haber sido detenida la agitación, en donde la concentración de 10 mg quitosano/L/g SV redujo la turbidez de la suspensión a un valor de 2.56 NTU.

El mecanismo de coagulación puede ser explicado mediante el concepto de neutralización de cargas en el cual, la presencia de cargas negativas en la superficie bacteriana es neutralizada por aquellas cargas contrarias que posee el quitosano al ser un polímero catiónico capaz de formar, además, puentes entre las diferentes partículas al interaccionar los grupos funcionales expuestos; de esta manera, cuando la cantidad apropiada de polímero es adsorbida, y las cargas son neutralizadas se lleva a cabo la floculación de las partículas. Por otro lado, se observa que para las concentraciones de 100 y 150 mg quitosano/L/g SV se produce un fenómeno inverso en el cual, la turbidez de la suspensión aumenta a 1785 y 1685 respectivamente después de 1 minuto de haber sido detenida la agitación.

Lo anterior es debido a la presencia de una concentración excesiva de polímero provocando que las partículas sean estables de nuevo y con ello se presente un aumento en la turbidez residual, fenómeno previamente descrito y conocido como estabilización estérica (Gregory y Barany, 2011), el cual ha sido reportado previamente por Black *et al.* (1966). Estos autores trabajaron con diferentes polímeros estudiando la floculación para su aplicación en plantas de tratamiento de aguas residuales, en donde se hizo evidente como las partículas en suspensión pueden volver a estabilizarse por un exceso de coagulante.

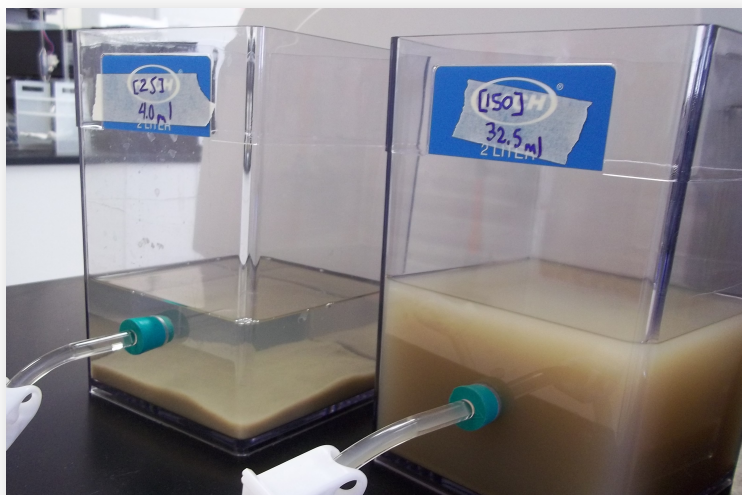


**Figura 3.2.** Determinación de la turbidez al minuto 1, 10, 20 y 30 a partir del momento en que se detuvo la agitación. La cantidad de quitosano adicionada fue: 5 (◆), 10 (x), 25 (▲), 50 (■), 100 (◐) y 150 (●) mg de quitosano/L/g SV.

### 3.2.1. Efectividad en la reducción de la turbidez

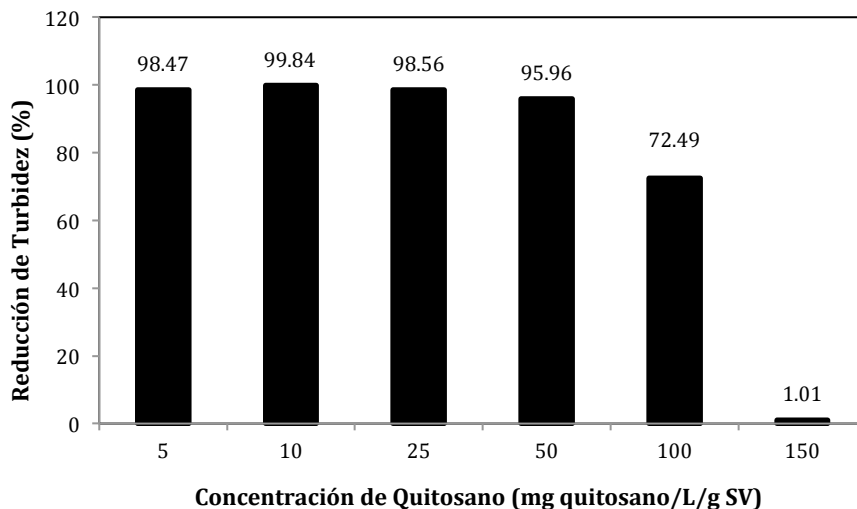
Para evaluar la efectividad de la floculación se expresaron los resultados en forma de porcentaje de reducción de la turbidez, evaluando la turbidez final, comparándola con el valor inicial de 1665 NTU de acuerdo con la jarra testigo. En la Figura 3.3. se puede apreciar un ejemplo de la prueba de jarras realizada, donde se comparan dos concentraciones de quitosano diferentes y la sedimentación que demuestra cual de las dos facilita la coagulación de la materia orgánica presente.





**Figura 3.3.** Fotografía donde se observa la diferencia en la sedimentación y disminución de la turbidez en la prueba de jarras para la concentración de 25 mg quitosano/L/g SV (izquierda) y 150 mg quitosano/L/g SV (derecha).

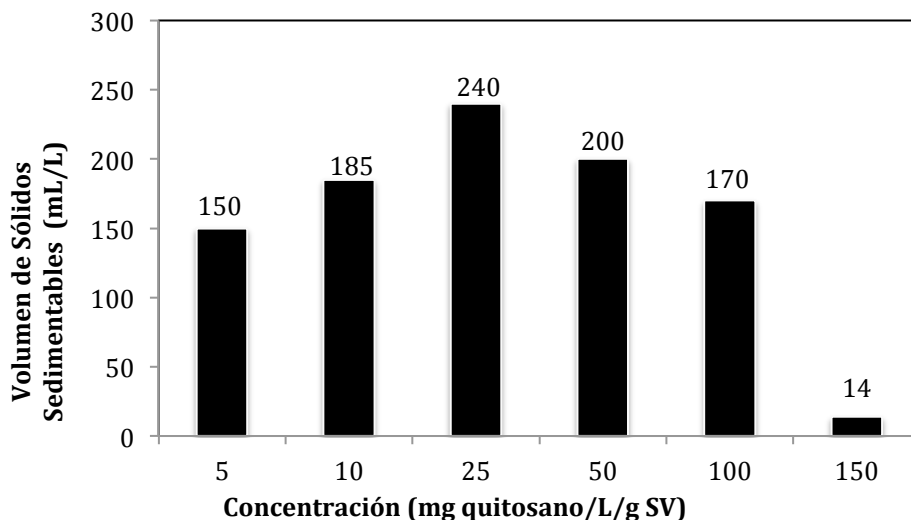
Con estos resultados se infiere que la concentración óptima de quitosano es de 10 mg/L/g SV ya que alcanzó un 99.8 % de reducción de la turbidez, tal como se muestra en la Figura 3.4. Cercano a estos valores la concentración de 5 y 25 mg quitosano/L/g SV presentan porcentajes de 98.4 y 98.5 % respectivamente. Estos datos son consistentes con lo reportado por El-mamouni *et al.*, (1998), y por Chi y Cheng (2006), quienes determinaron que la concentración de quitosano óptima fue de 25 mg/g SV y 25 mg/L respectivamente, sin embargo, en este trabajo la concentración óptima fue 2.5 veces menor en comparación con los trabajos antes mencionados.



**Figura 3.4.** Porcentaje de la reducción de turbidez para cada una de las concentraciones utilizadas al cabo de 30 min de reposo.

Cheng et al., (2005) reportaron que la concentración que produjo una mayor floculación fue de 120 mg quitosano/L a un pH de 4.5. Al realizar la comparación con este trabajo se observa que a las concentraciones de 100 y 150 mg quitosano/L/g SV, a un pH de 5.7, provocó la saturación de coagulante y con ello la ruptura de los puentes entre las partículas y el cambio de su carga superficial, lo que aumentó la turbidez, debido posiblemente a la re-estabilización de las partículas.

En la Figura 3.5. se observa que el volumen de sólidos sedimentables tiene un máximo de 240 mL/L para la concentración de 25 mg quitosano/L/g SV la cual se encuentra en la parte media de las concentraciones evaluadas dibujando una forma Gausiana en la gráfica. Cuando se agregó una concentración de 10 mg quitosano/L/g SV se obtuvo un volumen de 180 mL/L. Se observa además, una disminución en el volumen conforme la concentración superó los 50 mg quitosano/L/g SV siendo de solo 14 mL/L para una concentración de 150 mg quitosano/L/g SV.



**Figura 3.5.** Volumen de sólidos sedimentables en mL/L obtenidos a partir de la adición de quitosano en la prueba de jarras.

La relación entre el volumen de los sólidos sedimentables y la remoción de la turbidez nos ayuda a entender como es que se comportan las partículas y nos indica cual de las concentraciones probadas es la más adecuada para llevar a cabo la floculación de la biomasa. Para las concentraciones de 5 y 25 mg quitosano/L/g SV el porcentaje de reducción de turbidez fue de 98.47 y 98.56 % respectivamente, sin embargo, el volumen para cada una de las concentraciones tuvo una diferencia de 62% lo que nos indica un cambio en las características morfológicas que afectan el tamaño y la forma de los flóculos formados.

Cabe resaltar que a nivel nacional la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-127-SSA1-1994, SALUD AMBIENTAL. AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO establece como límite permisible 5 NTU de turbidez residual, comparando los resultados obtenidos en este trabajo con lo que describe la norma oficial se puede establecer al quitosano como un polímero natural capaz de ser utilizado en el tratamiento de aguas residuales que permite la floculación de partículas obteniendo resultados que caen dentro de los estándares oficiales.

### 3.3. INDUCCIÓN DE LA FORMACIÓN DE AGREGADOS EN UN REACTOR

#### CSTR.

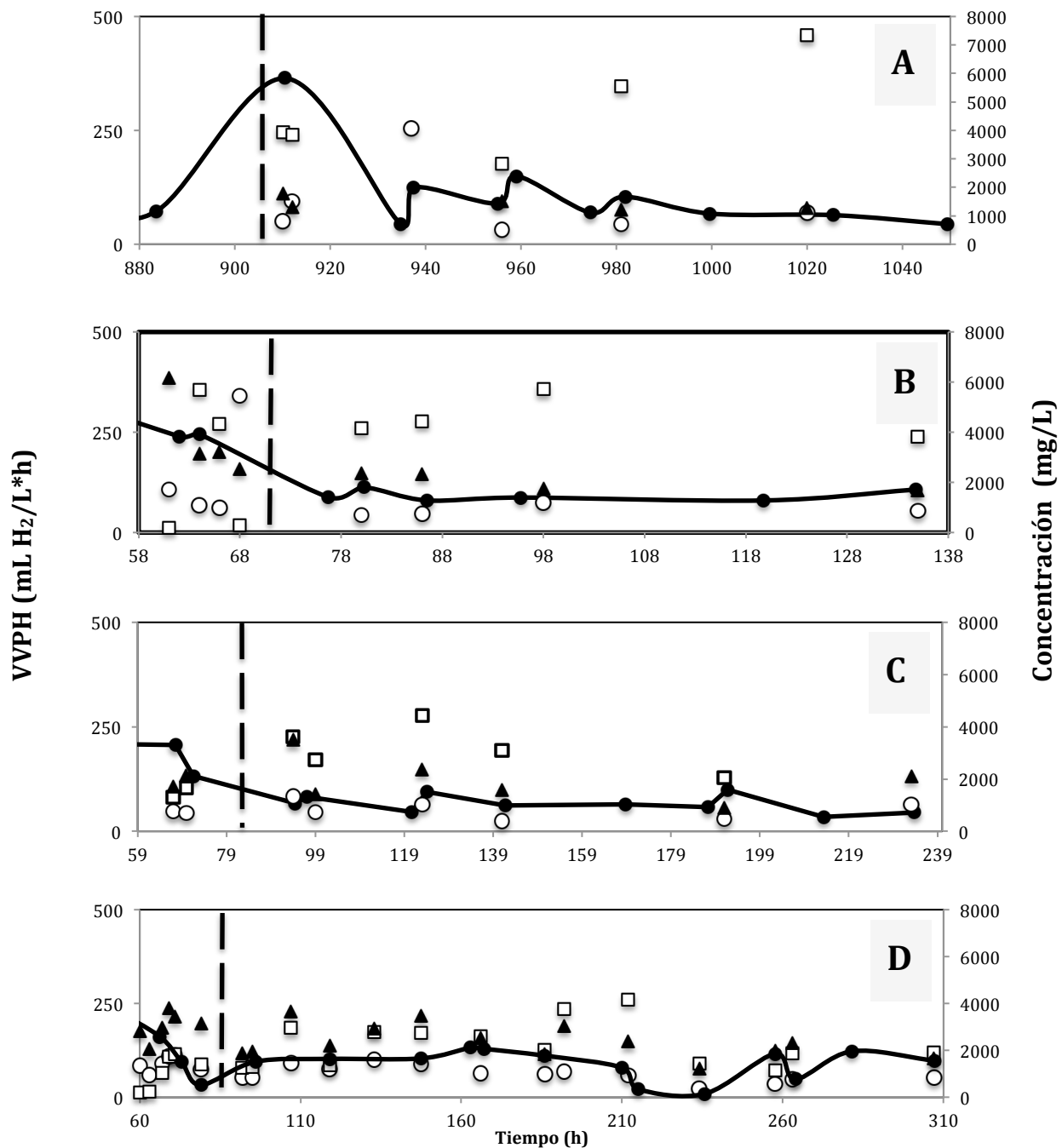
Una vez que se obtuvo la concentración de quitosano que produjo la mayor floculación de los sólidos suspendidos mediante la aplicación de la prueba de jarras, se procedió a realizar la inducción de la granulación en un reactor CSTR con un cultivo acidogénico. A continuación, se describirán de forma general los resultados de dos experimentos que servirán como ejemplo, y en los cuales además de medir la producción de hidrógeno, se determinó la concentración de los ácidos grasos volátiles producidos. Más adelante en este capítulo se hará una comparación entre la concentración de sólidos volátiles y sólidos sedimentables y como se relacionan con la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno. Para finalizar, se muestra la distribución del tamaño de partícula y la observaciones realizadas a los agregados formados mediante microscopía electrónica de barrido.

#### 3.3.1. Evaluación de la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) y AGV

En la Figura 3.6 se presentan los resultados obtenidos en los cuatro experimentos efectuados; se muestran los valores de VVPH y AGV a partir del momento en que se adicionó quitosano a los reactores. De manera general se observó que la producción de hidrógeno comenzó en promedio 12 horas después de arrancar el reactor. El color del inóculo utilizado fue inicialmente de color café oscuro, sin embargo, la coloración disminuyó gradualmente hasta convertirse en un color crema claro después de que pasaron 8 TRH. Durante el arranque de los reactores y el inicio del cultivo continuo la producción de hidrógeno tuvo velocidades altas comparadas con el estado estacionario. Para el caso específico del experimento I, se alcanzó una VVPH de 448 ml H<sub>2</sub>/L/h (dato no mostrado) después de 23 horas de haber arrancado el reactor. Este experimento tuvo una duración total de 1050 horas, la primera parte consistió en determinar la posible formación de gránulos de forma espontánea la cual, después de 900 horas no fue observada.

La segunda parte del experimento I se puede observar en la Figura 3.6a y corresponde con la inducción de la formación de agregados mediante el empleo de quitosano, el

cual, se agregó a un tiempo de 910 h. La VVPH promedio para este periodo fue de 100 mL H<sub>2</sub>/L/h. En esta segunda parte la utilización de quitosano permitió la formación de flóculos en un tiempo muy corto, gracias a la determinación de la concentración óptima en la prueba de jarras. La agregación de la biomasa, como se describirá más adelante, no logró la maduración y pocos flóculos crecieron y tuvieron la compactación suficiente para soportar el esfuerzo de corte provocado por la agitación, o simplemente las fuerzas electroestáticas que permitieron la acumulación se perdieron. Debido a esto, se observó que conforme avanzó el tiempo la biomasa se fue disgregando, acción que fue más clara al observar el color del seno del líquido, el cual, comenzó a cobrar un color lechoso similar a aquel que tenía antes de agregar quitosano.



**Figura 3.6.** Gráficas donde se muestran la producción de hidrógeno como VVPH (●) y la concentración de ácidos acético (○), propiónico (□) y butírico (▲) para los diferentes reactores a partir de la agregación de quitosano para la formación de gránulos. De arriba hacia abajo: a) experimento I, b) experimento II, c) experimento III y d) experimento IV. La línea punteada indica el momento en que se agregó quitosano.

A partir del experimento I se identificó que el crecimiento de los agregados formados no llegaba a una maduración completa, por el contrario, estos se disgregaron y se perdió la mayor parte de los flóculos formados después de 72 horas de haber agregado quitosano.

Por ello, se formuló el experimento II, inoculado con lodo sin disgregar para observar si la presencia de agregados previamente formados, facilitaba la creación de nuevos flóculos o aceleraba su maduración como fue reportado por Vivanco *et al.* (de acuerdo a lo reportado por Sheng *et al.*, 2010), además, las condiciones de agitación fueron modificadas de 80 a 120 rpm para el mantenimiento del reactor. La finalidad de aumentar la velocidad de agitación durante el periodo de mantenimiento fue generar condiciones hidrodinámicas que promovieran la maduración de los flóculos formados. La fuerza hidrodinámica, de acuerdo con Adav *et al.* (2007; de acuerdo a lo reportado por Sheng *et al.*, 2010), puede propiciar la producción y composición de los polímeros extracelulares con lo cual se podría promover la maduración de los gránulos.

El aumento en la agitación del reactor y el uso de lodo sin disgregar para fomentar la maduración de los flóculos y la consecuente granulación, no fue satisfactoria para los objetivos de este estudio por lo que a las condiciones de operación para los experimentos III y IV se adicionó un periodo de paro después de agregar quitosano en donde la agitación fue detenida, fomentando la formación de flóculos de gran tamaño.

De manera general la VVPH en el experimento II alcanzó un promedio de 80 mL H<sub>2</sub>/L/h con una duración total de 135 horas. Para el caso de los experimentos III y IV los resultados se muestran muy similares a los primeros dos experimentos, en donde se logró la formación de flóculos en un tiempo muy corto después de agregar el coagulante y su posterior disgregación en un tiempo promedio de 72 horas a pesar de haber realizado la modificación de la agitación como un factor que posibilitara la maduración de los flóculos a gránulos.

La producción de hidrógeno promedio en estado estable para los experimentos III y IV fue de 95 y 123 mL H<sub>2</sub>/L/h respectivamente, lo cual muestra que los resultados de los diferentes experimentos montados son similares entre sí. La relación de la producción de hidrógeno en estado estable entre este trabajo y otros publicados se puede observar en la siguiente tabla:

**Tabla 3.1.** Características de la producción de hidrógeno de diferentes trabajos reportados.

Sustrato	Carga orgánica (g/L/d)	VVPH (L/L/d)	Referencia
Glucosa	60	2.95	Este Trabajo
Sacarosa	48.6	13	Fang et al., 2002
glucosa	28	1.2	Nakamura et al., 1993
glucosa	480	76.8	Zhang et al., 2006
Glucosa	480	78.2	Show et al., 2007
Glucosa	NA	5.5	Liang et al., 2010
Sacarosa	960	7.3	Lee et al., 2004

NA. No aplica para el sistema utilizado.

De manera general la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno alcanzada en este trabajo en comparación con aquellos revisados es baja, lo cual tiene relación con las bajas velocidades de carga orgánica que se trabajaron ya que para aquellos trabajos donde se logran VVPH alrededor de 80 L/L/d se utilizaron cargas 8 veces mayores. Otro caso es de Lee *et al.*, (2004), en donde utilizan una carga orgánica de 960 g/L d y alcanzan una VVPH de 7.3 L/L d.

En la Figura 3.6 se presentan los perfiles de producción de AGV, siendo el propiónico el que se produjo en mayores concentraciones, alcanzando picos de hasta 17500 mg/L y un promedio de 4539 mg/L durante el tiempo de operación de los diferentes experimentos. El butírico fue el segundo metabolito en concentración con picos de hasta 12360 mg/L, mientras que el acético fue el que mantuvo las concentraciones más bajas con un promedio de 1026 mg/L.

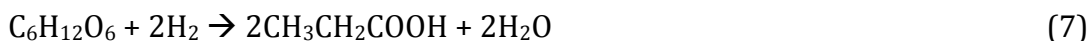
De manera general, se observó que la producción de AGV en los cuatro experimentos tuvo una producción de ácido propiónico menor durante los primeros 10 TRH, siendo el ácido butírico el que presentó la mayor concentración de los tres AGV determinados. Posteriormente, la concentración de ácido propiónico comenzó a



aumentar en el seno del líquido hasta ser el principal producto del metabolismo microbiano detectado.

La baja producción de hidrógeno en este tipo de fermentaciones se ha relacionado con la elevada concentración de ácido propiónico en el reactor, fungiendo como un indicador de la eficiencia del proceso. Uno de los factores que propician la acumulación de ácido propiónico en condiciones de anaerobiosis, donde el potencial de óxido-reducción (ORP) es menor a -150 mV, es el pH. Wang *et al.*, (2006) consideran que a pH 6 se favorece la fermentación butírica, a pH 5.5 la fermentación propiónica y por debajo de 4.5 la producción de etanol.

En el presente trabajo el pH se controló a 5.5 debido a que en trabajos anteriores (Dávila-Vázquez *et al.*, 2008), se obtuvo una mayor eficiencia en la producción de hidrógeno a estas condiciones, además, es un factor de selección para evitar la presencia de microorganismos consumidores de hidrógeno. En otros estudios, se relaciona la producción de hidrógeno con el TRH como un factor que propicia el mantenimiento de microorganismos que producen ácido propiónico como un producto principal. En trabajos como el publicado por Zhang *et al.*, (2006b) se analiza la producción de ácido propiónico ligada al TRH y, de manera general, se llegó a la conclusión de que a TRH bajos la concentración de este producto disminuye. La disminución en la producción de hidrógeno en el sistema está ligada a la presencia de ácido propiónico, ya que, para su generación intervienen dos moles de hidrógeno de acuerdo a la siguiente fórmula (Zhang *et al.*, 2006b):



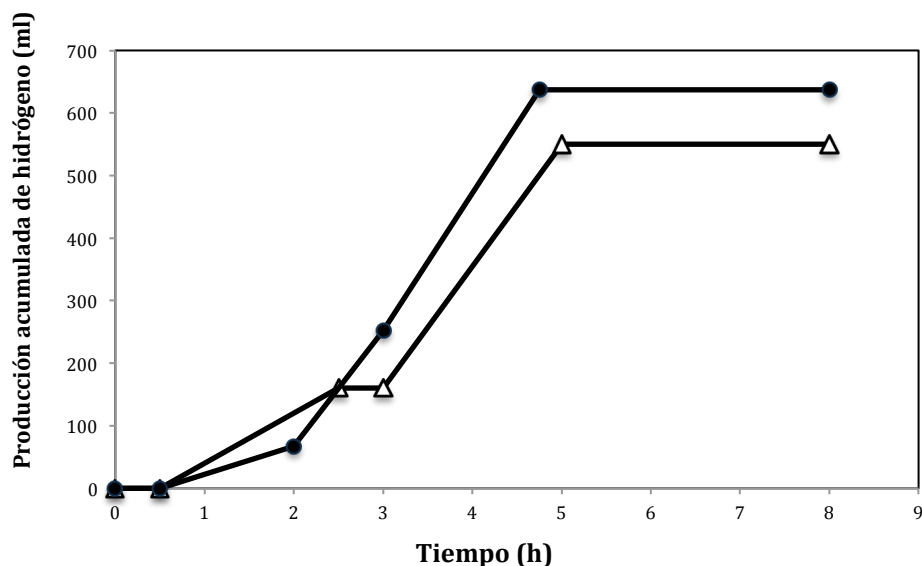
Aunado al TRH, otra de las razones que pueden sustentar el hecho de haber obtenido una baja producción de hidrógeno, se basa en el tipo de microorganismos que conformaban el consorcio con el cual se trabajó, ya que esto también es clave para la producción de hidrógeno. Además del pH y el tipo de consorcio utilizado, la presión parcial de hidrógeno ha sido descrita como un factor importante que puede provocar la inhibición de la producción de hidrógeno a medida que su concentración incrementa en el sistema (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2008).

Los estudios realizados por Harper y Pohland (1990) indican que una elevada presión parcial de hidrógeno tiene como resultado la acumulación de propiónico. Sin embargo, Inanc *et al.* (1990) realizaron diversos experimentos inyectando hidrógeno a diferentes concentraciones, encontrando que no hay inhibición o estimulación en la acumulación de este ácido. Otros estudios sugieren también que la acumulación es independiente de la presión parcial de hidrógeno proponiendo que en condiciones de elevada producción de NADH, la célula lo compensa mediante la propionogénesis, aumentando la producción de NAD<sup>+</sup> y regulando el sistema (Harper y Pohland, 1990; Qian y Min, (1986), de acuerdo a lo reportado por Wang *et al.*, 2006).

Wang *et al.*, (2006) sugieren que es posible prevenir la acumulación de ácido propiónico durante la fermentación para la producción de hidrógeno, mediante el mantenimiento de un ORP bajo (menor a -450 mV), debido a que éste ácido es producido por bacterias anaerobias facultativas. Otra alternativa para incrementar la eficiencia de producción de hidrógeno, es mediante el control del pH por debajo de 5.5 controlando la relación de NADH/NAD<sup>+</sup>.

3.3.2. Evaluación de la actividad de producción de hidrógeno en presencia de quitosano.

Para evaluar si el quitosano podría generar una disminución en la producción de hidrógeno, se realizaron pruebas de actividad en lote en las cuales se obtuvo biomasa del experimento II antes y después de agregar quitosano, de acuerdo con la metodología descrita en el capítulo 2. En la Figura 3.7 se observa la producción acumulada de hidrógeno en la cual, al agregar quitosano la producción es mayor alcanzando una producción acumulada de 637 mL de hidrógeno en 5 horas de incubación a 35 °C, mientras que el testigo sin quitosano se obtuvo una producción de 550 ml de hidrógeno en un lapso de tiempo similar y llegando a una producción promedio total de gas de 1080 mL.



**Figura 3.7.** Producción acumulada de hidrógeno en cultivo en lote antes (●) y después (▲) de haber agregado quitosano para formación de gránulos. La biomasa se obtuvo del experimento II. El porcentaje de hidrógeno en el biogás se mantuvo entre 50 y 60%.

n

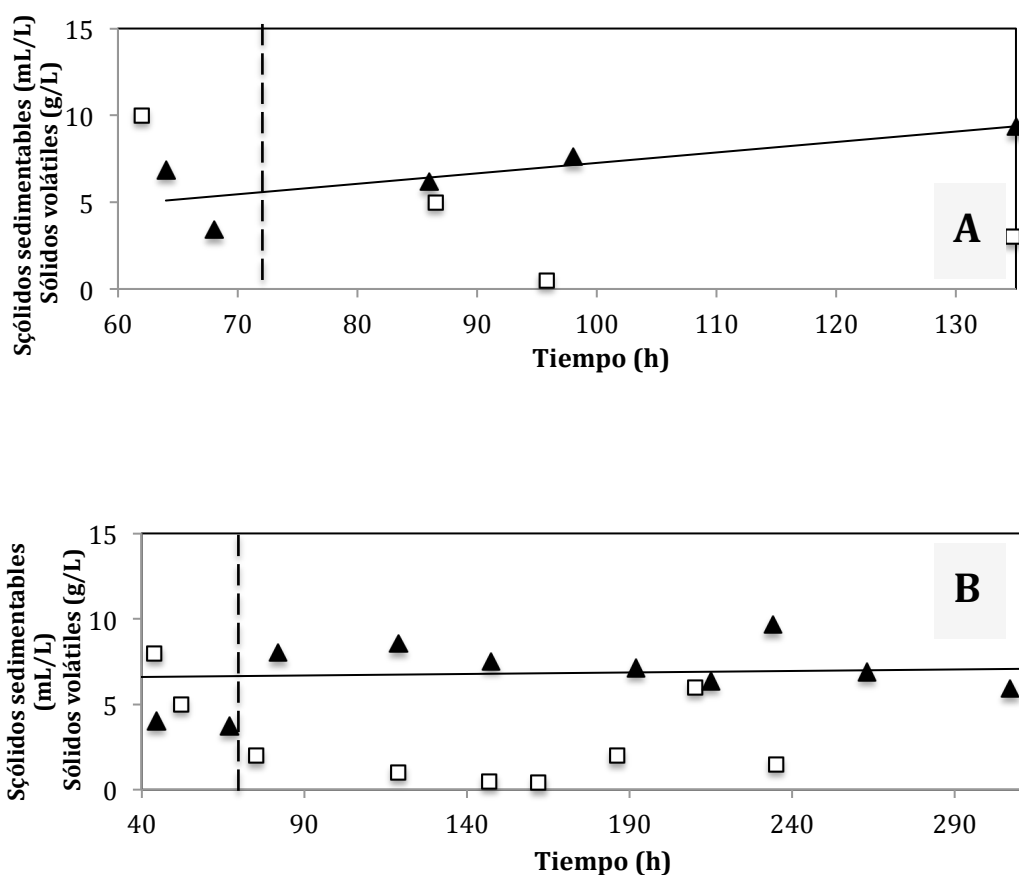
De esta manera se pudo determinar que el quitosano no afectó la producción de hidrógeno, por lo cual, se puede inferir que a la concentración probada no tiene efecto sobre la viabilidad y actividad de los microorganismos o que genere efectos inhibitorios sobre su crecimiento.

### 3.3.3. Sólidos Sedimentables y Sólidos Volátiles

Además de evaluar la producción de hidrógeno y ácidos grasos volátiles se realizó la determinación de los sólidos volátiles y sedimentables en el seno del líquido y en el efluente respectivamente. Estas determinaciones nos permitieron comparar la concentración de microorganismos (sólidos volátiles), con la presencia de flóculos, su tamaño y la producción de hidrógeno.

En la Figura 3.8 se presentan dos gráficas donde se compara la producción de hidrógeno y la concentración de sólidos volátiles y sedimentables para los experimentos II y IV. En el experimento II se observa que la concentración de sólidos sedimentables comenzó a descender de 10 a 0.5 mL/L en un tiempo de 33 horas,

posterior al cual se registra un aumento de 2.5 mL/L que se mantuvo 40 horas después. La concentración de sólidos volátiles en este experimento presentó una concentración mínima de 3.4 g SV/L, 68 horas después de iniciado el cultivo, incrementándose gradualmente hasta alcanzar un máximo de 9.3 g SV/L al final del experimento. Esto representa un aumento aproximado de 2.8 veces la concentración de sólidos antes de agregar quitosano, presentando una tendencia lineal ascendente, la cual no afectó positivamente la producción de hidrógeno pues ésta se mantuvo alrededor de 100 mL H<sub>2</sub>/L/h.



**Figura 3.8.** Perfil de la concentración de sólidos volátiles (▲) y sólidos sedimentables (◻) en función del tiempo, para los experimentos: A) experimento II y B) experimento IV. La línea punteada indica el momento en el que se agregó quitosano, mientras la línea continua indica la tendencia de la concentración de los sólidos volátiles durante el experimento.

En el experimento IV (Figura 3.8b), antes de agregar quitosano las concentraciones de sólidos volátiles se mantuvieron en un promedio de 4 g SV/L, llegando a tener una concentración máxima de 9.6 g SV/L y un promedio de 8 g SV/L, por lo que el incremento en los sólidos volátiles en ambos reactores fue similar. Este incremento es importante y se puede relacionar con el efecto del quitosano al facilitar la formación de flóculos y con ello el mantenimiento de la biomasa y su incremento en el sistema, lo cual es positivo. Con respecto a los sólidos sedimentables en el experimento IV, éstos se mantuvieron en concentraciones en promedio de 1 mL/L.

Algo que se puede observar es el incremento en la concentración de sólidos volátiles y la disminución en los sólidos sedimentables a las 235 h y que puede ser resultado de la reducción del TRH, consecuencia de un problema de operación ya que se aumentó la velocidad de alimentación y por lo tanto, aumentó también la carga orgánica. Esta reducción en el TRH permitió observar que la presencia de partículas en suspensión se incrementó, lo cual concuerda con el aumento de la concentración de sólidos volátiles en el reactor. La línea de tendencia del experimento II es ascendente, mientras que para el caso del experimento IV se mantiene constante aunque, el incremento en la concentración después de haber agregado quitosano es evidente. Al comparar estos resultados con los reportados por Davila-Vázquez (2008), en donde obtuvo concentraciones similares de sólidos volátiles con una carga orgánica mucho mayor.

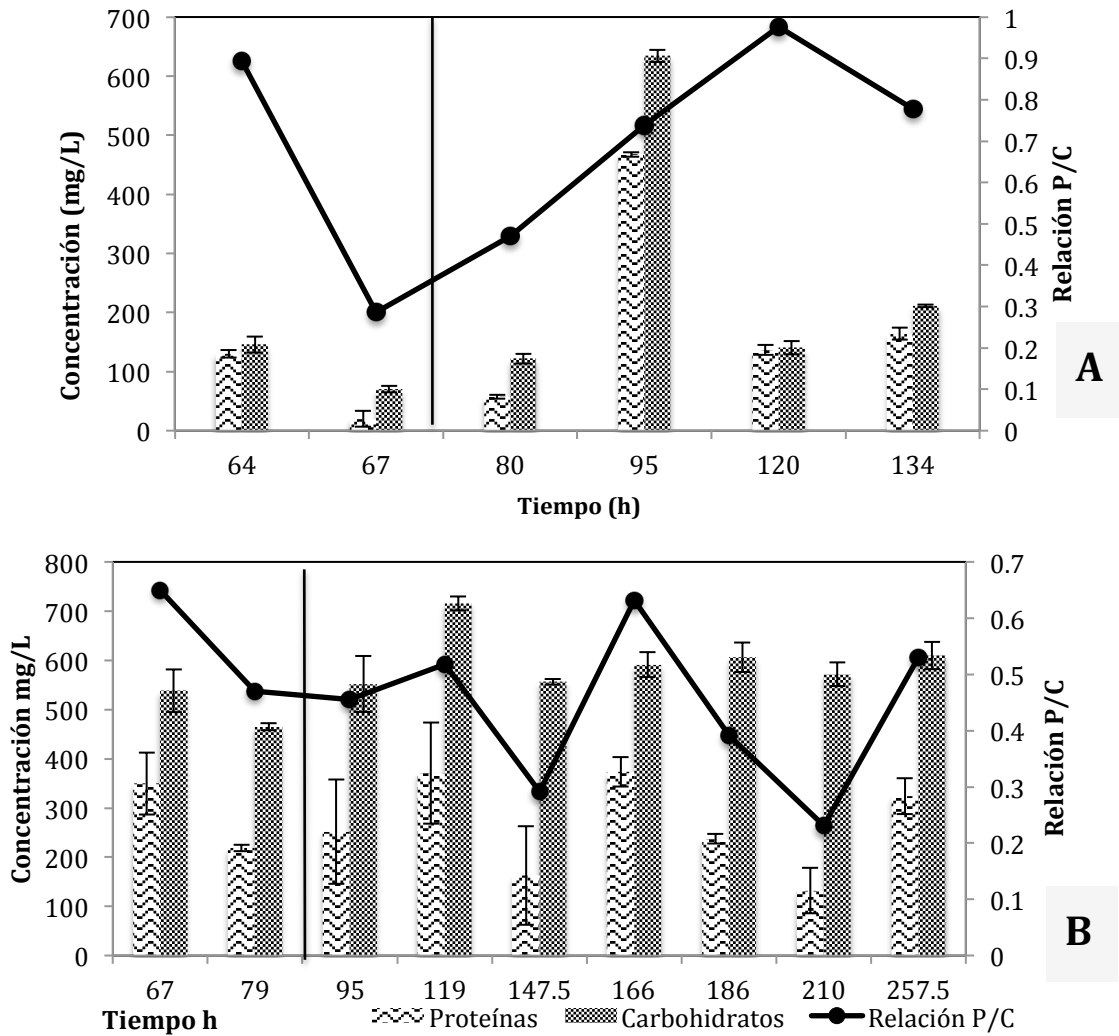
En trabajos como el de Fang *et al.*, (2006), la producción de hidrógeno alcanzó 13 L/L d con una concentración de 20 g/L SSV, lo cual es más del doble de la concentración promedio registrada en el presente trabajo. En el estudio realizado por Zhang *et al.*, (2006), la concentración de sólidos volátiles alcanzada fue de 35 g/L lo cual es casi 4 veces mayor y con ello se establece la diferencia en producción de hidrógeno entre ambos trabajos. Con estos datos se puede verificar que la concentración de microorganismos en el sistema es algo fundamental para poder obtener una elevada velocidad de producción de hidrógeno. Como parte del objetivo de este trabajo, se buscó elevar la concentración de sólidos volátiles mediante el empleo de un coagulante, y como se observa en los resultados, se incrementó

alrededor de 3 veces la concentración de sólidos utilizando quitosano, aunque la producción de hidrógeno no haya aumentado por el metabolismo microbiano dispuesto hacia la generación de ácido propiónico que, como ya se mencionó, utiliza hidrógeno en el proceso y por ende, disminuye el hidrógeno captado.

#### 3.3.4. Producción de Polímeros extracelulares

Para evaluar el contenido de polímeros extracelulares se realizó la extracción utilizando formaldehído y NaOH de acuerdo con los métodos descritos en el capítulo 2. Los resultados de la concentración de proteínas y carbohidratos para los experimentos II y IV en el material extracelular, así como la relación de proteínas entre carbohidratos (P/C), se muestran en la Figura 3.9. En la Figura 3.9a se observa que la concentración de PEC de carbohidratos y proteínas en el experimento II se mantuvo alrededor de 150 mg/L antes de agregar quitosano.

En el caso del experimento IV, en la figura 3.9b, se observa que antes de agregar quitosano las concentraciones de proteínas y carbohidratos están alrededor de 350 mg/L y 500 mg/L respectivamente. El contenido de los PEC es heterogéneo y se atribuye a diversos factores como son el tipo de cultivo, la fase de crecimiento el tipo de bioreactor y los procesos de extracción, entre otros (Nielsen y Jahn, 1999).



**Figura 3.9.** Resultados de la concentración de proteínas (Ondas), carbohidratos (Puntos blancos fondo negro y punteada) y la relación proteínas/carbohidratos (P/C), (●). A) experimento II y B) experimento IV. La línea negra indica el tiempo al cual se agregó quitosano.

Resalta el hecho de que en el experimento II, 29 horas después de haber agregado quitosano para propiciar la agregación celular, es decir, a un tiempo de operación de 95 horas (Figura 3.9A), la concentración de PEC aumentó un promedio de 5 veces, alcanzando valores de 634 mg/L y 467 mg/L para carbohidratos y proteínas respectivamente. En general se observó un aumento en la relación P/C después de agregar el quitosano, pasando de 0.28 una hora después de la adición del

polímero a 0.97 como valor máximo, 54 horas después (120 h de cultivo). Posterior a este tiempo tanto la concentración de PEC como la relación P/C disminuyeron, sin embargo los valores se mantuvieron por arriba de aquellos que se observaron antes de agregar quitosano..

En el caso del experimento IV (Figura 3.9B), se agregó quitosano 80 horas después del arranque del reactor. Se observó que la relación P/C comenzó a disminuir hasta llegar a 0.47 sin que haya presentado un cambio importante las primeras horas después de agregado el quitosano, teniendo una variación en donde la concentración de proteínas incrementó, y se obtuvo una relación P/C máxima posterior a la agregación de quitosano de 0.63.

De manera general se ha reportado que los principales componentes de los PEC son polisacáridos, proteínas y ADN; éste último puede servir como indicador del proceso de extracción de los PEC ya que su aumento puede significar el rompimiento celular y por lo tanto, la liberación de material celular que podría incrementar la concentración de proteínas y polisacáridos en el medio. Con la búsqueda bibliográfica que se llevó a cabo se eligió el método reportado por Liu y Fang (2002), en donde se agregó formaldehído y NaOH 1N a 4°C por 3 h.

La relación de proteínas y carbohidratos (P/C) para ambos experimentos se mantuvo entre 0.2 y 0.9, lo cual concuerda con los datos reportados en otros trabajos, donde relaciones menores de uno se vinculan con la presencia de microorganismos productores de hidrógeno utilizando diferentes tipos de bioreactores se ha demostrado que la cantidad total de PEC producidos no es un factor decisivo en la formación y estabilidad, sin embargo, la relación P/C tiene un papel crucial en las características de los gránulos (Liu et al., 2004).

De acuerdo con Jung et al. (2011), estas características sugieren que relaciones de P/C menores a 1, en donde la concentración de carbohidratos se incrementa, responde a la remoción de biomasa no activa mientras que el aumento en la concentración de proteínas esta relacionado con el tipo de consorcio presente en el reactor, siendo para los consorcios productores de hidrógeno menor que para los



consorcios metanogénicos por lo cual los resultados presentados en esta investigación nos indican la presencia de un consorcio productor de hidrógeno.

En trabajos como el de Liu y Tay (2002), se ha mencionado al esfuerzo de corte como un factor importante asociado a la sobreproducción de PEC y principalmente a la producción de polisacáridos. Sin embargo, la magnitud exacta del esfuerzo de corte y las condiciones hidrodinámicas que estimulan cambios metabólicos para la producción de PEC y específicamente de polisacáridos todavía no son claros de acuerdo a lo descrito por los autores antes mencionados.

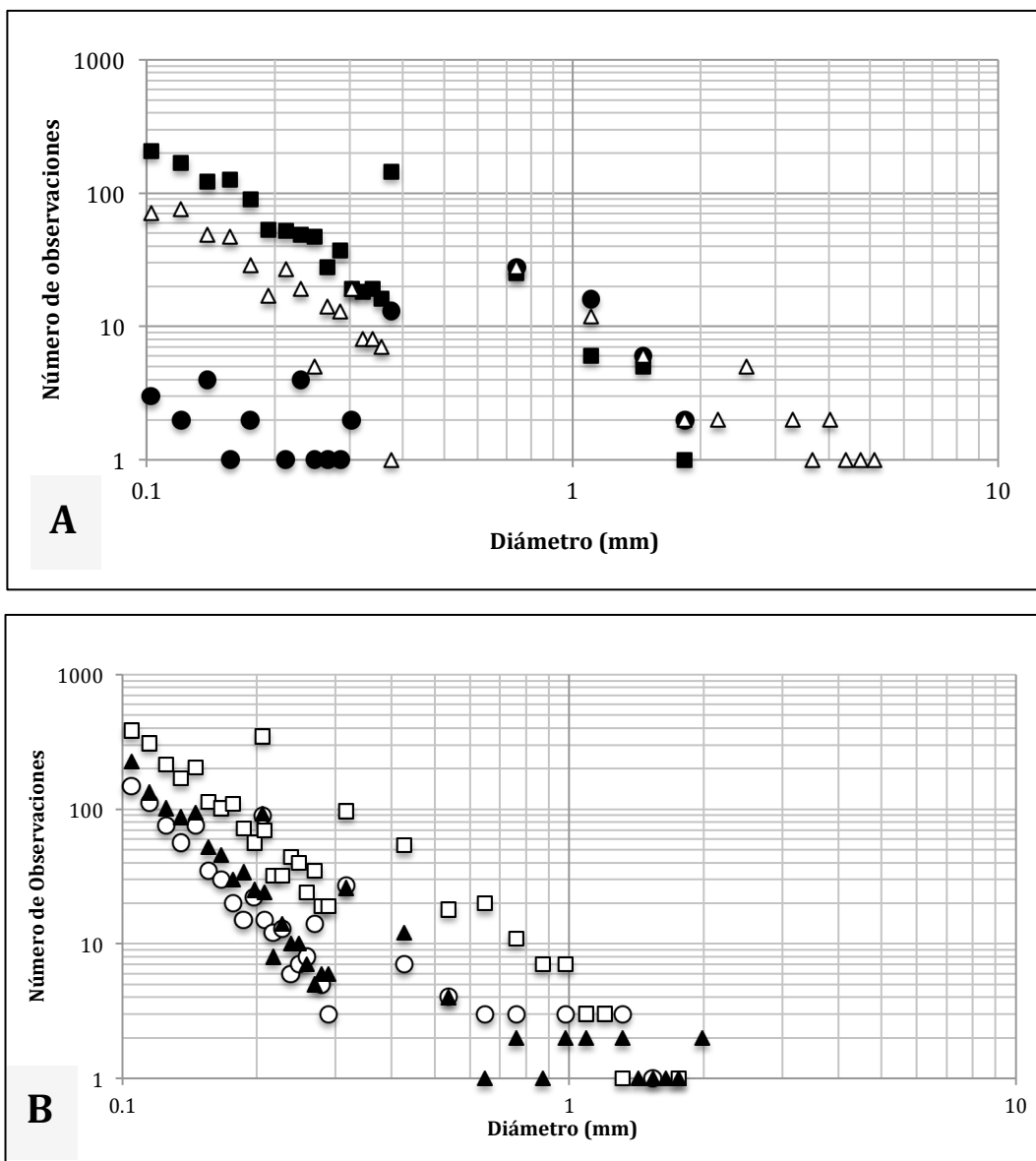
Para el caso de los ácidos urónicos determinados como parte de los PEC éstos aumentaron después de agregar el quitosano llegando a concentraciones de 2463 mg/L y disminuyendo después de 60 h de agregado el quitosano (Datos no mostrados. En general para el experimento IV la concentración de ácido urónico se mantuvo alrededor de 1900 mg/L. ). En este trabajo la concentración de ácido urónico fue varias veces mayor que la de carbohidratos (dato no mostrado), en contraste, la relación entre carbohidratos y ácido urónico reportada en la mayoría de los trabajos es a la inversa, ya que el ácido urónico se mantiene en concentraciones mucho menores que las de los carbohidratos. Los ácidos urónicos por su conformación química tienen la capacidad de formar complejos con diferentes iones como  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  facilitando el anclaje y, al mismo tiempo, controlando el mecanismo de la degradación de PEC al utilizar estos iones como agente oxidante, además, ayuda a la unión entre moléculas poliméricas lo que resulta en una mayor cohesión en los flóculos al formar parte de los mucopolisacáridos (Wingender et al., 1999; Pal y Paul, 2008). Con base en lo anterior, la alta producción de ácidos urónicos como parte de la producción de PEC en este consorcio podría ser utilizado para la remoción de cationes en el agua.

### 3.3.5. Distribución de tamaño de partícula.

Para conocer de que manera como los agregados incrementaron o disminuyeron en tamaño a lo largo de cada uno de los experimentos realizados, se determinó la distribución del tamaño de partícula mediante el uso de un microscopio

estereoscópico, esto permitió obtener imágenes digitales de las diferentes muestras evaluadas.

Durante el tratamiento de las muestras se cuidó disminuir el ruido en las imágenes para evitar que fuera contado como parte de los agregados mediante el uso de diferentes filtros. Los resultados de la distribución se presentan en la Figura 3.10. en donde se observa la relación del número de partículas contadas, y el tamaño de las partículas obtenidas de los experimentos II y IV (Figura 3.10a y 3.10b respectivamente).



**Figura 3.10.** Distribución del tamaño de partícula a partir de la aplicación de quitosano. La figura superior A) experimento II presenta los datos antes de agregar quitosano (●), 1 hora (■) y 65 horas (▲) después de agregar quitosano, respectivamente. B) Experimento IV en donde se observa la distribución 4 horas antes de agregar quitosano (○), 8 horas (□) y 153 horas (▲) después de agregar quitosano, respectivamente.

De manera general para los diferentes experimentos realizados se encontró que 95% de los datos correspondieron a tamaños de partículas por debajo de 0.3 mm. Para poder visualizarlos se generó una gráfica logarítmica en la cual se pudo comparar el tamaño de las partículas con los diferentes datos obtenidos para cada una de las observaciones. Los resultados del experimento II, Figura 3.10A, muestran un incremento en el número de partículas registradas, después de haber agregado quitosano a una concentración de 10 mg/L/g SV, en el rango de 0.1 a 0.3 mm al compararlo con la muestra que no contenía quitosano, en donde el número de partículas registrado fue menor.

En la Figura 3.10B correspondiente al experimento IV, se presentan los resultados de tres tiempos diferentes donde el primero corresponde al cultivo antes de agregar quitosano, el segundo 8 h después de haber agregado el polímero y el último 153 h después. Se puede observar un comportamiento similar en la distribución del tamaño de partícula en este experimento con respecto al del experimento II. De forma general se puede observar que el número de observaciones sin haber agregado quitosano tiene un mayor número de registros para partículas entre 0.1 y 0.3 mm de diámetro 4 horas antes de agregar el polímero.

Para cada uno de los experimentos se agregó quitosano y se mantuvo la agitación, después se disminuyó a 40 rpm durante 2 minutos. Posterior a este momento, se observó la floculación de la biomasa en el reactor, lo cual incrementaba al detener completamente la agitación por unos minutos, tal como se explicó en el capítulo 2. Con este procedimiento el líquido en el reactor fue clarificado, lo cual contrastó de forma notoria con el tratamiento sin quitosano que se mantuvo como testigo en el experimento I y con todos los demás experimentos antes de agregar quitosano. Sin embargo, al cabo de 24 horas se observó el rompimiento de los flóculos formados y el incremento de partículas de menor tamaño que las formadas después

de haber agregado quitosano, lo cual, se puede explicar por la falta de cohesión en los diferentes agregados que pudieron ser afectados por el esfuerzo de corte en el seno del líquido.

Fue claro que al agregar quitosano se observó un incremento importante en el tamaño de las partículas, principalmente para aquellas de tamaños entre 0.3 y 0.5 mm de diámetro formando flóculos irregulares debido a un efecto de coagulación. Además, conforme el tiempo avanzó, los flóculos incrementaron en tamaño como resultado de la colisión entre partículas pequeñas con aquellas de mayor tamaño.

Estos resultados se comparan con lo reportado por Spicer *et al.*, (1996), en donde describen que la estructura de los flóculos y el incremento en su tamaño es resultado de la colisión entre agregados, y definen a la composición de los flóculos grandes como la unión de muchos otros pequeños de manera aleatoria. Sin embargo, los agregados microbianos son susceptibles al rompimiento perdiendo su configuración; esto debido a las condiciones ambientales a las que se vean sometidos. El tamaño que éstos tengan (entre mayor sea su tamaño mayor será su capacidad de rompimiento), la concentración de las partículas y el pH de la solución, son factores que afectan la integridad de los agregados. Es así como los agregados formados alcanzaron un tamaño máximo, después del cual comenzaron a disgregarse por rompimiento. Como se observa en la Figura 3.10b, a las 8 horas después de agregar el quitosano el tamaño de las partículas fue mayor que aquellas antes de agregar el polímero, lo cual se puede considerar como el balance entre el rompimiento y la agregación en estado estable, de acuerdo a lo descrito por Spicer *et al.* (1996) y Soos *et al.* (2008).

La agitación en cada uno de los experimentos afectó La distribución del tamaño de los agregados; es decir, la disgregación de los flóculos pudo deberse a la erosión de la superficie o al rompimiento de las partículas. En este contexto, He *et al.*, (2012), analizaron la evolución del tamaño de flóculos, y su estructura en condiciones de velocidades de agitación bajas, concluyendo que el rompimiento de los flóculos era más importante a medida que aumentaba la velocidad de agitación, además, el rompimiento de los flóculos y su posterior crecimiento generaron flóculos más

compactos y de mayor tamaño. De acuerdo con las observaciones realizadas en el presente trabajo se deduce que la disminución en el número de agregados con el tiempo pudo ser principalmente por la erosión de los mismos, mientras que la presencia de gránulos en el reactor pudo deberse a la maduración de algunos agregados, logrando alcanzar diámetros mayores a 1 mm, como lo describe Sheng *et al.*, (2012).

En una investigación realizada por He *et al.* (2012), en donde analizan el rompimiento y la maduración de agregados microbianos concluyen que a mayor esfuerzo de corte, el crecimiento de los agregados es mayor al inicio de la floculación, además, mencionan que la fragmentación acompañada de una nueva adherencia es más efectiva para la formación de agregados compactos y de gran tamaño que aquella formación por erosión de flóculos y gránulos.

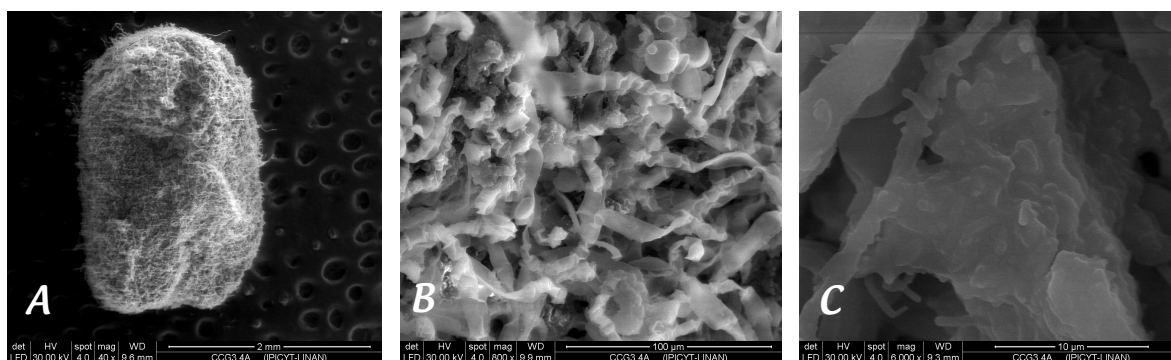
Es evidente que la adición de quitosano propició la formación de flóculos y la consecuente retención de la biomasa en el sistema, lo que se pudo observar al evaluar la concentración de sólidos suspendidos en el seno del líquido ya que éstos aumentaron casi 3 veces. Por otro lado la concentración de PEC también está relacionada con la formación de flóculos y gránulos al ser estos polímeros los encargados de mantener a las células microbianas unidas en una matriz. En este sentido los polímeros tuvieron un cambio evidente al agregar quitosano como se mencionó en la sección anterior.

### 3.3.6. Observación de agregados mediante microscopía electrónica

Las características microscópicas de los agregados microbianos se evaluaron mediante la observación de los flóculos y gránulos formados utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en Inglés). En la Figura 3.11 se presentan tres fotografías a diferentes aumentos de un gránulo tomado del experimento III la un tiempo de 70 horas después de haber adicionado quitosano. Se observó que los gránulos estuvieron formados principalmente por microorganismos de formas bacilares, algunos productores de hidrógeno como las bacterias acidogénicas que producen hidrógeno a partir de carbohidratos son de forma bacilar (por ejemplo, *Clostridium butyricum*).

Además de la observación de las formas celulares, se visualizó una gran cantidad de PEC rodeando a las células, lo cual ha sido reportado ampliamente en otros trabajos (Shang et al., 2006; Fang y liu, 2001 y Liu et al., 2004). Dichos autores coinciden en que la presencia de estos PEC funcionan como un pegamento natural, en el cual se encuentran inmersas las células. Además, en presencia de factores de estrés como cambios de pH y agentes tóxicos, los PEC tienen la capacidad de amortiguar los efectos negativos del medio ambiente que pueden causar estrés a las células.

En la Figura 3.11A se observa la estructura del agregado celular a una magnificación de 40x, el cual tiene un diámetro alrededor de 2 mm y está compuesto por una gran cantidad de PEC. A un acercamiento de 880x, la Figura 3.11B presenta la superficie granular detectándose una gran cantidad de filamentos que conforman la matriz granular, en donde se encuentran inmersas las células bacterianas (Figura 3.11c).



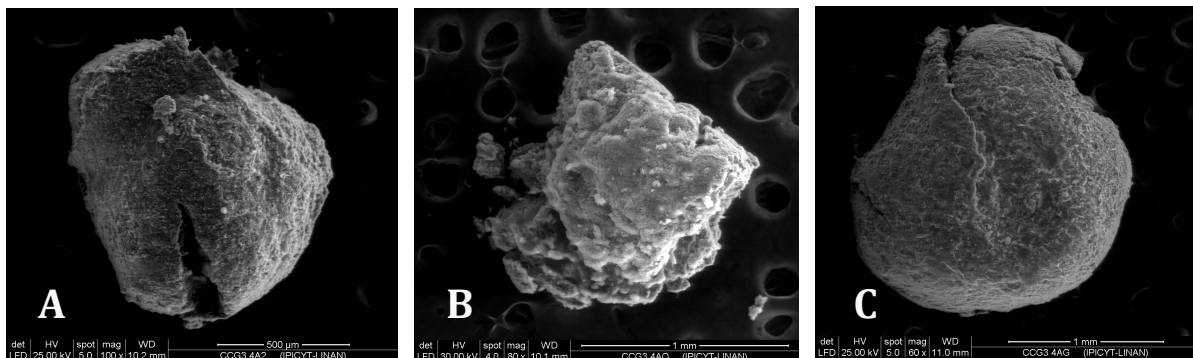
**Figura 3.11.** Observación en el microscopio electrónico de barrido de un gránulo formado después de 70 horas de haber agregado quitosano en el experimento III. A) observación global de la estructura granular a un aumento de 40X, B) presencia de una gran cantidad de polímeros extracelulares a 800X y C) células bacterianas inmersas en los biopolímeros a 6000X.

Trabajos anteriores han descrito la formación de estos gránulos productores de hidrógeno en un tiempo de 2 a 4.5 meses (Chang y Lin, 2004; Fang et al., 2002; Yu y Mu, 2006), por lo que la formación de agregados en el presente trabajo tiene una clara ventaja desde el punto de vista del tiempo requerido para su formación, en contraste con los trabajos anteriormente descritos. Por otro lado, algunos trabajos han generado gránulos en tiempos cortos empleando como estrategia la disminución del pH,

logrando que la respuesta celular a un ambiente estresante genere cambios en la superficie microbiana acelerando la formación de gránulos 114 h después de la incubación ácida (Zhang *et al.*, 2006), tiempo que, comparado con los agregados desarrollados durante el presente trabajo, es similar.

La granulación resulta, como ya se ha mencionado anteriormente, de la organización de los microorganismos de manera compacta, quedando inmersos en una matriz polimérica, la cual se muestra en la Figura 3.11C en la cual se puede apreciar la existencia de una gran cantidad de polímeros extracelulares, que mantienen a los microorganismos inmersos, coincidiendo con las observaciones realizadas por diferentes investigadores (de Beer *et al.*, 1996; Tay *et al.*, 2001; McSwain *et al.*, 2005).

La Figura 3.12 muestra diferentes imágenes de gránulos formados en el experimento III en donde se observa la morfología de los agregados y la presencia de rupturas en la superficie, lo cual crea canales por donde se puede realizar el transporte e intercambio de sustrato y productos microbianos del centro del gránulo a la periferia, además de servir para la liberación de hidrógeno, gas que tiene una baja solubilidad en agua, de 1.58 mg/L (Fang *et al.*, 2002).



**Figura 3.12.** Observación mediante SEM de tres gránulos obtenidos a partir de la aplicación de quitosano. A) observación global de la estructura granular a un aumento de 100X, B) 80X y C) 60X

Cada uno de los agregados presentados en esta figura tiene un tamaño que supera el diámetro de 500 µm, dicho tamaño se considera una característica de

longitud por arriba de la cual se pueden designar como gránulos y dejan de ser clasificados como flóculos.

Gracias a la realización de estas observaciones se pudo documentar la presencia de bacterias de formas bacilares en los agregados microbianos y su desarrollo dentro de los PEC que las mantienen unidas. Los agregados observados alcanzaron un tamaño cercano a los dos milímetros de diámetro por lo que se pueden considerar como agregados granulares, punto central en el desarrollo de este trabajo el cual buscó la formación de gránulos a partir de la utilización de un polímero que acelerara la agregación celular, el quitosano.



# Capítulo IV

## Conclusiones y Recomendaciones

### 4.1. CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó la factibilidad de utilizar quitosano como un polímero natural que facilitara la interacción entre células y con ello favorecer su floculación para posteriormente llevar a la formación de gránulos.

- Los resultados de esta investigación indican claramente que el quitosano es un polímero que puede ser utilizado a bajas concentraciones para iniciar y acelerar la formación de agregados microbianos en un reactor CSTR.
- Los resultados de la prueba de jarras indican que la concentración con la cual se obtiene una mayor eficiencia de floculación es de 10 mg quitosano/L/g SV a un pH de 5.7 y con una concentración de sólidos volátiles de 2.5 g/L.
- El uso de la prueba de jarras permitió llevar a cabo una evaluación del coagulante de una manera sistemática para las diferentes concentraciones alcanzando una eficiencia de 99.8% en la reducción de la turbidez.
- El quitosano es un polímero natural que podría utilizarse en el tratamiento de aguas residuales como un coagulante eficaz ya que logró reducir la turbidez

por debajo de 5 NTU como lo indica la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-127-SSA1-1994, SALUD AMBIENTAL. AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO.

- Se logró realizar la formación de gránulos microbianos con diámetros alrededor de 2 mm, 70 horas después de agregar quitosano.
- La carga orgánica de trabajo aplicada en esta investigación fue relativamente baja (60 g/L/d), alcanzando VVPH alrededor de 100 mL H<sub>2</sub>/L/d. Siendo el ácido propiónico el producto principal del metabolismo microbiano.
- La formación de agregados microbianos por efecto del quitosano generó un incremento aproximado de 3 veces la concentración inicial de sólidos volátiles, manteniendo un promedio alrededor de 8 g SV/L.
- En este estudio se llevó a cabo la extracción y caracterización de los polímeros extracelulares que formaban parte de los agregados microbianos, encontrando una mayor concentración de ácido urónico lo cual, puede generar ventajas para el tratamiento de agua con una alta carga de cationes.
- La agitación, y en general las condiciones hidrodinámicas, tienen un papel fundamental en la formación y maduración de los agregados microbianos.

## 4.2. RECOMENDACIONES

- Para mejorar la formación y maduración de gránulos es necesario investigar el efecto del esfuerzo de corte y la hidrodinámica sobre el metabolismo microbiano en la producción de PEC a nivel molecular y genético.
- Desarrollar estudios de ecología microbiana utilizando técnicas de biología molecular para conocer e identificar los microorganismos involucrados en la producción de hidrógeno y aquellos que componen los consorcios en los gránulos.
- Evaluar diferentes velocidades de agitación para analizar el efecto que tiene la hidrodinámica y el esfuerzo de corte sobre la formación y maduración de los gránulos.
- Estudiar la formación de gránulos empleando quitosano en diferentes reactores que faciliten la retención de biomasa como son el reactor anaerobio de lecho de lodos o el reactor anaerobio de lecho expandido (UASB y EGSB, respectivamente por sus siglas en Inglés)

# Capítulo 5

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA, AWWA & WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 1998, Washington, USA: American Public Health Association.

Bartels JR, Pate MB, Olson NK. An economic survey of hydrogen production from conventional and alternative energy sources. *Int J Hydrogen Energy*. 2010. 35:8371-8384.

Beer D de, Flaharty VO, Thareesri J, Lens P, Verstraete W. Distribution of extracellular polysaccharides and flotation of anaerobic sludge. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1996. 46:197–201.

Bedoya A, Castrillón JC, Ramírez JE, Vásquez JE, Zabala MA. Producción biológica de hidrógeno: Una aproximación al estado del arte. *Dyna*. 2008. 75:137-157.

Bhunia P, Ghangrekar MM. Effects of cationic polymer on performance of UASB reactors treating a low strength wastewater. *Biores Technol*. 2008. 99:350-358.

Black et al., 1966.

Cakara D, Frasc L, Bracic M, Kleinschek KS. Protonation behavior of cotton fabric with irreversibly adsorbed chitosan: A potentiometric titration study. *Carb Pol*. 2009. 78:36-40.

Carl-Jochen W. Hydrogen energy – abundant, efficient, clean: A debate over the energy-system-of change. *Int J Hydrogen Energy*. 2009. 34:S1-S52.

Chang FY, Lin CY. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *Int J Hydrogen Energy*. 2004. 29(1):33–39.

Cheng WP, Chi FH, Yu RF, Lee YC. Using chitosan as a coagulant in recovery of organic matters from the mash and lauter wastewater of brewery. *J Polym Environ*. 2005. 13:384-388.

- Chi FH, Cheng WP. Use of Chitosan as Coagulant to Treat Wastewater from Milk Processing Plant. *J Polym Environ*. 2006. 14:411–417.
- D'Abzac P, Bordas F, Joussein E, Van Hullebusch E, Lens PNL, Guibaud G. Characterization of the mineral fraction associated to extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges. *Environ Sci Technol*. 2010. 44:412-418.
- Das D, Veziroglu TN. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int J Hydrogen Energy*. 2001. 26:13-28.
- Das D, Veziroglu TN. Advances in biological hydrogen production processes. *Int J Hydrogen Energy*. 2008. 33:6046-6057.
- Davila-Vazquez G, Alatraste-Mondragón F, de León- Rodríguez A, Razo-Flores E. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: influence of initial substrate concentration and pH. *Int J Hydrogen Energy*. 2008. 33:4989–4997.
- El-Mamouni R, Leduc R, Guiot, SR. Influence of synthetic and natural polymers on the anaerobic granulation process. *Water Sci Technol*. 1998. 38:341-347.
- Fang HHP. Microbial distribution in UASB granules and its resulting effects. *Water Sci Technol*. 2000. 42:201–208.
- Fang HHP, Liu H. Granulation of a hydrogen-producing acidogenic sludge. In: *Proceeding Part 2 of 9th World Congress Anaerobic Digestion*, vol. 2; 2001. p. 527-32.
- Fang HHP, Liu H, Zhang T. Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnol Bioeng*. 2002. 78:44-52.
- Frølund, B., Griebe, T., Nielsen, P.H. Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1995. 43, 755–761.
- Frølund B, Palmgren R, Keiding K, Nielsen P. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res*. 1996. 30:1749–1758.
- Gregory J, Barany S. Adsorption and flocculation by polymers and polymer mixtures. *Adv Colloid and Interphase Sci*. 2011. 169:1-12.
- Hallenbeck PC, Benneman JR. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrogen Energy*. 2002. 27:1185-1193.

Harper SR, Pohland FG. Effects of elevated hydrogen partial pressures on anaerobic treatment of carbohydrate. In: Belaich JP, editor. Microbiology and biochemistry of strict anaerobes involved in interspecies hydrogen transfer. New York: Plenum Press; 1990. p. 387–90.

He W, Nan J, Li H, Li S. Characteristic analysis on temporal evolution of floc size and structure in low-shear flow. *Water Res.* 2012. 46:509-520.

Hoffmann P. 1981. The forever fuel: the story of hydrogen. West View Press. Boulder, Colorado. 271 pp.

Hulshoff Pol LW, Castro Lopez SI, Lettinga G, Lens PNL. Anaerobic sludge granulation. *Water Res.* 2004. 38:1376-1389.

Inanc B, Matsui S, Ide S. Anaerobic digestion of carbohydrates: an investigation on the role of hydrogen gas. *Wat Sci Technol.* 1999. 40:93-100.

Jeong HS, Kim YH, Yeom SH, Song BK, Lee SI. Facilitated UASB granule formation using organic-inorganic hybrid polymers. *Process Biochem.* 2005. 40:89-94.

Jung KW, Kim DH, Shin HS. A simple method to reduce the start-up period in a H<sub>2</sub>-producing UASB reactor. *Int J Hydrogen Energy.* 2011. 36:1466-1473.

Kataoka N, Miya A, Kiriya K. Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen producing anaerobic bacteria. *Water Sci Technol.* 1997. 36:41–47.

Kalinci Y, Hepbasli A, Dincer I. Biomass-based hydrogen production: A review and analysis. *Int J Hydrogen Energy.* 2009. 34:8799-8817.

Kintner, P.K., Van Buren, J.P. Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using m-hydroxy-diphenyl method. *J. Food Sci.* 1982. 47:756–760.

Lee KS, Wu JF, Lo YS, Lo YC, Lin PJ, Chang JS. Anaerobic Hydrogen Production With an efficient carrier-induced granular sludge bed bioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 2004. 87:648-657.

Lee KS, Lo YC, Lin PJ, Chang JS. Improving biohydrogen production in a carrier-induced granular sludge bed by altering physical configuration and agitation pattern of the bioreactor. *Int J Hydrogen Energy.* 2006. 31:1648-1657.

Lettinga G, Pette KC, de Vletter R, Wind E. Anaerobic treatment of beet sugar wastewater on semi-technical scale. CSM-report. The Netherlands: Amsterdam; 1977.

- Liang DW, Shayegan SS, Ng WJ, He J. Development and characteristics of rapidly formed hydrogen-producing granules in an acidic anaerobic sequencing batch reactor (AnSBR). *Biochem Eng J.* 2010. 49:119-125.
- Liu H, Fang HHP. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J Biotechnol.* 2002. 95:249-256.
- Liu Y, Tay JH. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Res.* 2002. 36:1653-1665.
- Liu Y, Xu HL, Yang SF, Tay JH. Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Res.* 2003. 37:661-673.
- Liu YQ, Liu Y, Tay JH. The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004. 65:143-168.
- Mahmoud N, Zeeman G, Gijzen H, Lettinga G. Solids removal in upflow anaerobic reactors, a review. *Bioresour Technol.* 2003. 90:1-9.
- Marban G, Solis TV. Towards the hydrogen economy. *Int J Hydrogen Energy.* 2007. 32:1625-37.
- McSwain BS, Irvine RL, Hausner M, Wilderer PA. Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Appl Environ Microbiol.* 2005. 71:1051-7.
- Meher SK, Das D. Biohydrogen as a renewable energy resource – Prospects and potentials-. *Int J Hydrogen Energy.* 2008. 33:258-263.
- Morgan JW, Evison LM, Forster CF. Internal architecture of anaerobic sludge granules. *J Chem Technol Biotechnol.* 1991. 50:211-226.
- Nakamura M, Kanbe H, Matsumoto J. Fundamental studies on hydrogen production in the acid forming phase and its bacteria in anaerobic treatment processes: the effects of solids retention time. *Water Sci Technol.* 1993. 28:81-88.
- Ni M, Leung DY, Leung MK, Sumathy K. An overview of hydrogen production from biomass. *Fuels Process Technol.* 2006. 87:461-72.
- Pal A, Paul AK. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian J Microbiol.* 2008. 48:49-64.

Peniche C, C. A. Estudios sobre quitina y quitosana. Tesis de Doctorado. Universidad de la Habana, Cuba. 2006.

Qian Z, Min H. Methanogenic fermentation microbiology. Zhejiang, China: Zhejiang Sci Technol Publication. 1986.

Schmidt JE, Ahring BK. Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnol Bioeng*, 1996. 49:229–246.

Sinha P, Pandey A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *Int J Hydrogen Energy*. 2011. 36:7460-7478.

Sheng GP, Yu HQ, Li XY. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological water treatment systems: A review. *Biotech Advances*. 2010. 28:882-894.

Show KY, Zhang ZP, Tay JH, Liang DT, Lee DJ, Jiang WJ. Production of hydrogen in a granular sludge-based anaerobic continuous stirred tank reactor. *Int. J. Hydrogen Energy*. 2007. 32:4744-4753.

Show KY, Zhang ZP, Tay JH, Liang DT, Lee DJ, Ren N, Wang A. Critical assessment of anaerobic processes for continuous biohydrogen production from organic wastewater. *Int J Hydrogen Energy*. 2010. 35:13350-13355.

Soos M, Moussa AS, Ehrl L, Sefcik J, Wu Hua, Morbidelli M. Effect of shear rate on aggregate size and morphology investigated under turbulent conditions in stirred tank. *J Colloid Interface Sci*. 2008. 319:577-589.

Spicer PT, Keller W, Pratsinis SE. The effect of impeller type on floc size and structure during Shear-induced flocculation. *J. Colloid and Interface Sci*. 1996. 184:112-122.

Tay JH, Liu QS, Liu Y. The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Lett Appl Microbiol*. 2001. 33:222–226.

Turner JA. Sustainable hydrogen production. *Science*. 2004. 305:972.

Uyanik S, Sallis PJ, Anderson GK. The effect of polymer addition on granulation in an anaerobic baffled reactor (ABR). Part I: process performance. *Wat Res*. 2002. 36:933-943.

Valdez-Vazques I, Poggi-Varaldo HM. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Rev*. 2009. 13:1000-1013.

Wang Y, Show KY, Tay JH, Sim KH. Effects of cationic polymer on start-up and granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *J Chem Technol Biotechnol*. 2004. 79:219-228.



Wang L, Zhou Q, Li FT. Avoiding propionic acid accumulation in the anaerobic process for biohydrogen production. *Biomass and bioenergy*. 2006. 30:177-182.

Wingender J, Neu TR, Flemming HC. *Microbial Extracellular polymeric substances: Characterization, structures and function*. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. 1999. 190-192.

Yu HQ, Mu Y.. Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. II: Reactor performance in 3-year operation. *Biotechnol Bioeng*. 2006. 94(5):988–995.

Zhang ZP, Show KY, Tay JH, Liang DT, Lee DJ, Jiang WH. Rapid formation of hydrogen-producing granules in an anaerobic continuous stirred tank reactor induced by acid incubation. *Biotech and Bioengin*. 2006. 96:1040-1049.

Zhang ZP, Show KY, Tay JH, Liang DT, Lee DJ, Jiang WJ. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochem*. 2006b. 41:2118-2123.

Zhang ZP, Adav SS, Show KY, Tay JH, Liang DT, Lee DJ, Su A. Characteristics of Rapidly Formed Hydrogen-Producing Granules and Biofilms. *Biotech and Bioengin*. 2008a. 101:926-936.

Zhang ZP, Show KY, Tay JH, Liang DT, Lee DJ. Enhanced continuous biohydrogen production by immobilized anaerobic microflora. *Energy & Fuels*. 2008b; 22:87-92.