



UNIVERSIDAD DEL MAR
Campus Puerto Ángel

EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS
CINÉTICOS DE LA CONVERSIÓN DE CELULOSA
EN HIDRÓGENO EMPLEANDO CONSORCIOS
MICROBIANOS

T E S I S

Que para obtener el Título Profesional de
INGENIERA AMBIENTAL

Presenta:

Ana Laura Morales García

Directora:

Dra. Idania Valdez Vazquez

Puerto Ángel, Pochutla, Oaxaca.

2016

ÍNDICE

1	RESUMEN	8
2	INTRODUCCIÓN	10
2.1	Situación de los sistemas agrícolas sustentables en México	10
2.2	Biocombustibles a partir de materiales lignocelulósicos	11
3	MARCO TEÓRICO	14
3.1	Hidrógeno como combustible	14
3.2	Métodos termoquímicos de producción de hidrógeno.....	15
3.3	Métodos biológicos de producción de H ₂	17
3.3.1	Biofotólisis	17
3.3.2	Fotofermentación.....	19
3.3.3	Fermentación anaerobia	19
3.4	Parámetros que influyen en la producción de H ₂ vía fermentación.....	21
3.4.1	Sustratos utilizados.....	21
3.4.2	Fuentes de inóculo	22
3.4.3	Consortios microbianos	23
3.4.4	pH.....	24
3.4.5	Tiempo de retención hidráulico (TRH)	25
3.4.6	Temperatura	26
3.4.7	Tipos de reactores usados en la producción fermentativa de H ₂	28
3.5	Modelos empleados en la producción fermentativa de hidrógeno	29
3.5.1	Modelo de Monod	30
4	JUSTIFICACIÓN	35
5	OBJETIVOS	37
5.1	Objetivo general.....	37
5.2	Objetivos particulares	37
6	HIPÓTESIS	38
6.1	Hipótesis general	38
6.2	Hipótesis particulares	38

7	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
7.1	Biorreactores semi-continuos y diseño experimental (Pre-ensayos)	39
7.2	Biorreactores en lote y diseño experimental (determinación de parámetros cinéticos)	41
7.3	Métodos analíticos.....	43
7.3.1	Volumen y composición de biogás.....	43
7.3.2	Determinación del crecimiento celular	44
7.3.3	Determinación del consumo de sustrato	45
7.3.4	Análisis por microscopía confocal láser de barrido	46
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
8.1	Producción de H ₂ a partir de celulosa cristalina en biorreactores semi-continuos (aclimatación de los consorcios microbianos)	48
8.2	Producción de H ₂ a partir de paja de trigo (efecto de la concentración de sustrato sobre la producción de hidrógeno)	51
9	CONCLUSIONES.....	68
10	LITERATURA REVISADA	70
11	ANEXOS	82
11.1	ANEXO A. Cálculo de los parámetros cinéticos utilizando el modelo de Monod	82
11.2	ANEXO B. Análisis de la varianza (ANOVA) de los datos de consumo de sustrato para cada inóculo	84

Índice de cuadros

Cuadro 1	Municipios de México con el mayor potencial de energía estimado	13
Cuadro 2	Ejemplos de microorganismos que tienen la capacidad de producir hidrógeno	20
Cuadro 3	Efecto de la temperatura en la producción fermentativa de hidrógeno	28
Cuadro 4	Modelos empleados en la producción fermentativa de hidrógeno	34
Cuadro 5	Composición de la paja de trigo utilizada en éste estudio	43

Cuadro 6	Comparación de estudios donde se ha evaluado el efecto de la concentración de sustrato sobre la producción de en reactores en lote	59
Cuadro 7	Parámetros cinéticos determinados para los diferentes inóculos utilizando distintas concentraciones de paja de trigo	62
Cuadro 8	Porcentaje de consumo de sustrato a diferentes concentraciones de paja de trigo	66

Índice de figuras

Figura 1	Diseño del sistema de Biorreactores en lote alimentado	40
Figura 2	Producción de biogás en biorreactores semi-continuos alimentados con celulosa cristalina.	49
Figura 3	Crecimiento microbiano medido como proteína total en biorreactores alimentados con celulosa cristalina e inoculados con suelo, rumen y lodos de PTAR	49
Figura 4	Evolución del pH en los biorreactores semicontinuos alimentados con celulosa cristalina inoculados con suelo, rumen y lodos de PTAR	50
Figura 5	Cinéticas de producción de hidrógeno a diferentes concentraciones de sustrato y tipos de inóculo	52
Figura 6	Velocidad de producción de hidrógeno y rendimiento de hidrógeno en función de la concentración de sustrato y tipo de inóculo	53
Figura 7	Cinéticas de crecimiento durante la producción de hidrógeno	61
Figura 8	Efecto de la concentración de sustrato sobre la tasa de crecimiento	62
Figura 9	Análisis con el microscopio confocal de barrido láser la degradación de la epidermis de paja de trigo	65

Índice de ilustraciones

Ilustración 1	Dependencia de la tasa de crecimiento específica sobre la concentración del sustrato limitante.	31
Ilustración 2	Representación gráfica de la ecuación de Monod linealizada usando el método de Lineweaver-Burk.	32

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber financiado el trabajo experimental mediante los proyectos N° 168921 de Ciencia Básica 2011 titulado “Estudio ecológico y evolutivo de la estructura y funcionalidad de comunidades hidrogenogénicas sometidas a perturbaciones ambientales” y N° 188432 del Fondo “Apoyo al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica”.

Al Dr. Francisco R. Quiroz Figueroa del Lab. de Fitomejoramiento Molecular del Depto. de Biotecnología Agrícola, CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa por el análisis de las muestras con el microscopio confocal láser de barrido.

A mi directora la Dra. Idania Valdez Vazquez por su paciencia y enseñanzas a lo largo del proceso de la tesis, apoyarme y compartir sus conocimientos. A mis compañeros del laboratorio de bioprocesos, al Dr. Carlos Molina, al Ing. Aníbal Lara por el apoyo brindado en las técnicas, uso de equipos y ayuda para resolver mis dudas.

A la Universidad de Guanajuato por el uso de las instalaciones del laboratorio de bioprocesos ambientales donde se llevaron a cabo los experimentos de ésta tesis.

A mis revisores, Alejandro Regalado Méndez, Belém Espinosa Chávez, Susana García Ortega y Carlos Estrada Vázquez por el tiempo brindado para realizar las correcciones oportunas que contribuyeron a mejorar éste trabajo.

A mis profesores de la Universidad del Mar cuyas clases, tareas, asesorías, exámenes a casa y/o bajo presión hicieron me convirtiera en más responsable de lo que pensé podía lograr, gracias por sus consejos, las vivencias y hasta los regaños compartidos dentro y fuera de clase.

Parte de los resultados de éste trabajo fueron presentados en:

XII Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana del hidrógeno, Aguascalientes, Ags. 2013: *“Evaluation of different natural microbial consortia for H₂ production from crystalline cellulose”*.

Primer Simposium Internacional de Bioingeniería Ambiental, Guanajuato, Gto. 2013: *“Effect of substrate concentration on biogas production (biohydrogen) from wheat straw by natural microbial consortia”*.

DEDICATORIAS

Especialmente a mis padres Eloy y Florinda por todos los sacrificios realizados a lo largo de los años para darnos una mejor calidad de vida, por su amor, paciencia, consejos, por brindarme un lugar seguro al cual regresar siempre y en el cual algún día estaremos todos juntos: nuestra casa. Los amo inmensamente.

A mis hermanos Juan Carlos, Rusbel y Elioenai por su apoyo incondicional aunque los haga enojar de vez en cuando, por estar siempre conmigo y compartir tanto desde niños, por las ilusiones y metas que poco a poco estamos cumpliendo.

A mis abuelos que son la raíz de todo, mi ejemplo a seguir, de quienes aprendí que la familia es lo más importante, y de los cuales siempre me sorprende su bondad y calidez a donde quiera que voy.

A mis compañeros de grupo Mayra, Julián, Faustino y Emmanuel sin olvidar a Jocelyn, Zury, Iris y Gloria por las experiencias vividas dentro y fuera de clases que no terminaría de narrar nunca (desde los días malos, frustrantes, irónicos, con desánimo, estudiar para los exámenes, los “extras”, las horas eternas en simulación con todo y amaneceres incluidos, las cervezas en la playa, los atardeceres en Zipolite, compartir nuestra pobreza de “estudiahambres”, las mudanzas, el equipo de fut, el de voleibol, las fiestas, nuestras peleas, reconciliaciones, el compañerismo...) y las cuales seguimos compartiendo, forman parte importante de mi vida chicos, ¡gracias por su amistad!

A todas esas personas maravillosas que he encontrado en mi camino, Idania por ser tan buena onda, una persona y profesionista admirable, por brindarme la confianza y apoyo desde que nos conocemos, Martín por nuestras locuras con Juanito, los días de cocinar, las aventuras, las risas, nuestra amistad y hermandad interminable, ¡los quiero mucho! Liz por compartir tantas cosas, la universidad con todo y sus altibajos, Ensenada, Irapuato, los viajes, los días malos, graciosos, desesperantes, felices...¡y tantos momentos inolvidables!, Joce por brindarme tu amistad, darme asesorías de termodinámica, balance y cuanta materia se acumulara, Iris por tus llamadas y locuras que siempre me hacen reír, Zury contra la adversidad por tu buena vibra, Gloris (súper Glow) por siempre subirme el ánimo y ser una excelente amiga, César por la gran afinidad y amistad que compartimos desde el primer día que te conocí, Omar por ser tan genial, Regalado, Juan Carlos (Peludito), las Timmy (Elia, Ale, Viri), los F5 (Sofi, Edith, Andrea, Félix, Esteban, wpw, Mosqueda, El gallo) por la buena onda, a mis amigos de toda la vida Josué, Indira, Toño, Yuri, Bania, Anais, Gladys...con quienes comparto una convicción y una historia digna de contar y repetir (¡son los mejores!). A quienes no mencioné pero siempre están en mi mente, no encuentro las palabras necesarias para resumir el efecto que han tenido en mí, llevo un poquito de ustedes en el camino recorrido y el que aún me falta, los admiro y aprecio mucho. Gracias por formar parte de ésta etapa tan significativa de mi vida y las que están por llegar.

NOMENCLATURA

CG	Cromatografía de gases
DCT	Detector de conductividad térmica
G	tiempo de generación del crecimiento exponencial de la población; $g=t_f/n$
H ₂	Hidrógeno
K	constante de velocidad
K _s	Constante de Monod; la concentración de sustrato al 50% de la tasa específica de crecimiento máxima ($\mu_{\max}/2$)
N	número de generaciones durante el período de crecimiento exponencial; donde n puede calcularse como $n = \frac{\text{Log}(N) - \text{Log}(N_0)}{\text{Log}(2)}$
N ₀	número inicial de células
N	número final de células
S	Concentración del sustrato (g/L)
STV	Sólidos totales volátiles
t _f	duración del crecimiento exponencial en minutos, horas, días, etc.
μ	Tasa específica de crecimiento (h ⁻¹), que puede calcularse usando $\mu = \frac{\text{Ln}(2)}{g}$
μ_{\max}	Tasa de crecimiento específico máxima (h ⁻¹)

1 RESUMEN

La producción biológica de hidrógeno (H_2) representa una alternativa para generar energía renovable, la cual en un futuro cercano puede contribuir a diversificar la oferta energética. Entre los procesos biológicos utilizados para generar H_2 se encuentra la fermentación anaerobia, en la cual se emplean distintas fuentes de carbono que van desde azúcares simples como glucosa hasta polisacáridos como celulosa. Actualmente, la producción de H_2 a partir de biomasa lignocelulósica ha tomado importancia debido a que son sustratos de bajo costo, con alta disponibilidad y ampliamente distribuidos en el territorio nacional. La bioconversión de la biomasa lignocelulósica en H_2 puede llevarse a cabo gracias a la acción de consorcios microbianos, que debido a su diversidad son capaces de realizar la hidrólisis y fermentación en un sólo paso.

El objetivo de este trabajo consistió en determinar los parámetros cinéticos de tres consorcios microbianos provenientes de fuentes naturales (lodos anaerobios de un digester metanogénico, la microflora nativa de la paja de trigo y rumen de vaca) durante la producción de H_2 a partir de la fermentación de paja de trigo en biorreactores en lote utilizando la ecuación de Monod. Se realizaron fermentaciones en lote en condiciones mesofílicas con diferentes concentraciones de sustrato (1 – 5 % de sólidos totales). Las variables medidas fueron: tasa de crecimiento, producción, rendimiento y velocidad de producción de H_2 . Se encontró que para todos los inóculos la tasa de crecimiento incrementó con el aumento de la concentración de sustrato: las mayores tasas de crecimiento se lograron con lodos anaerobios > rumen > microflora nativa. La producción, rendimiento y velocidad de producción de H_2 también tuvieron una respuesta positiva con el aumento de la concentración de sustrato: el mejor desempeño se logró con la microflora nativa (321 mL H_2 /L, 8 mL H_2 /g sólido volátil total y 27 mL H_2 /L-d, respectivamente). Los resultados de la constante de saturación para la ecuación de Monod (K_s ; g/L) fueron: 99 para los lodos anaerobios, 33 para el rumen y 32 para la microflora nativa. Finalmente, se determinó por microscopía confocal de barrido láser, que la mayor degradación y deformación de la pared celular de las fibras de paja de trigo la realizó la microflora nativa.

Palabras Clave: consorcios microbianos, fermentación, hidrógeno, paja de trigo.

Abstract

The biological hydrogen (H₂) production represents an option to obtain renewable energy, which in a near future could contribute to diversify the energetic offer. Among the biological H₂ production processes, the anaerobic fermentation uses different carbon sources as feedstock including simple sugars and complex polysaccharides such as cellulose. Currently, the biological H₂ production from lignocellulosic biomass is of great interest because this feedstock has low cost, and it is widely available and distributed in the national territory. Microbial consortia carry out the bioconversion of lignocellulosic biomass into H₂ because they have a great diversity capable of hydrolyzing and fermenting in the same reactor.

The objective of this work was to determine the kinetic parameters of three natural microbial consortia (anaerobic sludge from a methanogenic reactor, native microflora of the wheat straw and cow rumen) during the fermentative H₂ production from wheat straw based on Monod model. Batch reactors were loaded with different substrate concentrations (1- 5 % of total solids) and incubated statically under mesophilic conditions. The measured variables were: growth, production, yield and production rate of H₂.

The growth rate of all consortia increased with the substrate increment: in descending order the growth rates were anaerobic sludge > rumen > native microflora. The production, yield and production rate of hydrogen had a positive response to the substrate increment: the native microflora has the best performance (321 mL H₂/L, 8 mL H₂ /g TSV and 27 mL H₂ /L·d, respectively). The saturation constants for the Monod's model (K_s; g/L) were: 99 for anaerobic sludge, 33 for rumen and 32 for native microflora. Finally, the native microflora accomplished the major degradation and deformation of the wheat straw cell wall visualized by confocal laser scanning microscopy.

Keywords: microbial consortia, fermentation, hydrogen, wheat straw.