



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

**PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN UN REACTOR CON
BIOMASA FIJA**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERÍA

INGENIERÍA AMBIENTAL

P R E S E N T A :

Gamaliel Hernández Cadenas

TUTOR:

Dr. Germán Buitrón Méndez



fecha



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE PROYECTO FUE FINANCIADO POR SEP-CONACYT
A TRAVÉS DEL PROYECTO 100298

*A mis papás por todo su apoyo,
por alentarme cuando venía el desgano
y por todas sus oraciones porque este día llegara,
por estar siempre que los necesito. Gracias*

*A mis hermanos Samuel, Maritza y Ludim por siempre apoyarme,
por sus consejos, por su impulso para llegar hasta aquí,
por ayudarme a creer que esto era posible.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Germán Buitrón por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, por la dirección de este trabajo, por sus acertadas críticas, por su ayuda cada vez que fue necesaria.

Al Dr. Adalberto Noyola y a la Dra. Georgina Fernández por sus observaciones y correcciones que enriquecieron este trabajo. Su ayuda fue elemental.

Al Maestro Jaime Pérez Trevilla y a la Maestra Gloria Moreno por su asistencia técnica, por su amistad, por estar siempre dispuestos a ayudar, mil gracias.

A Carlos Cervantes y a Rodolfo Amaya, por su amistad, por compartir estos dos años, por su apoyo, por su ayuda, por compartir los buenos y malos momentos, por sus consejos, por animarme siempre, muchas gracias.

A la comunidad lipatense Eva, Gerardo, Carlos Cuando, Ivonne, Dorian, Christian, Xitlalli, Victor, y Jorge, gracias por todos sus comentarios.

A Pepe Diaz por ayudarme a creer que lo lograría y por su compañía en las noches de desvelo.

A mi cuñado Ricardo Carrillo por todo su apoyo, muchas gracias.

Y por encima de todos los anteriores, a Dios, porque sin Él nada de lo que es hubiera sido.

| | |
|--|-----------|
| ÍNDICE | |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 8 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 10 |
| RESUMEN | 11 |
| INTRODUCCIÓN | 12 |
| OBJETIVOS..... | 14 |
| Objetivo General | 14 |
| Objetivos particulares..... | 14 |
| CAPÍTULO 1 | 15 |
| ANTECEDENTES | 15 |
| 1.1 Digestion Anaerobia..... | 17 |
| 1.1.1 Hidrólisis y Acidogénesis..... | 18 |
| 1.1.2 Acetogénesis..... | 18 |
| 1.1.3 Metanogénesis..... | 18 |
| 1.2 Métodos de producción de hidrógeno | 20 |
| 1.2.1 Biofotólisis | 22 |
| 1.2.2 Biofotólisis Indirecta..... | 23 |
| 1.2.3 Fotofermentación | 24 |
| 1.2.4 Fermentación..... | 25 |
| 1.3 Factores que afectan la producción de hidrógeno | 29 |
| 1.3.1 Inóculo..... | 29 |
| 1.3.1.1 Pretratamiento del Inóculo | 32 |
| 1.3.2 Sustrato..... | 33 |
| 1.3.3 Tipo de Reactor y Tiempo de retención hidráulica | 36 |
| 1.3.4 Nitrógeno y Fosfato..... | 37 |
| 1.3.5 Iones Metálicos | 38 |
| 1.3.6 Temperatura | 39 |
| 1.3.7 pH..... | 40 |
| 1.3.8 Presión parcial de H ₂ | 41 |
| 1.4 Microorganismos productores de Hidrógeno | 41 |

| | |
|--|-----------|
| 1.4.1 Otros microorganismos | 42 |
| 1.5 Biopelículas..... | 44 |
| 1.5.1 Formación de las biopelículas | 44 |
| 1.5.2 Estructura de las biopelículas | 44 |
| 1.5.3 Biopelículas VS bacterias plantónicas | 45 |
| 1.5.4 ¿Por qué biomasa fija? | 47 |
| 1.6 Reactores con biomasa fija..... | 48 |
| CAPÍTULO 2 | 49 |
| METODOLOGÍA | 49 |
| 2.1 Estrategia experimental | 49 |
| 2.2 Inóculo..... | 49 |
| 2.3 Medición del biogás | 50 |
| 2.4 Pruebas de colonización de los empaques..... | 50 |
| 2.5 Operación de los reactores | 51 |
| 2.6 Análisis cinético | 51 |
| 2.7 Evaluación del efecto de la alcalinidad sobre la producción de H ₂ | 51 |
| 2.8 Técnicas analíticas..... | 52 |
| 2.8.1 Cuantificación de H ₂ , CO ₂ y CH ₄ | 52 |
| 2.8.2 Ácidos grasos volátiles y solventes | 52 |
| 2.8.3 Determinación de la colonización de los empaques..... | 52 |
| 2.8.4 Glucosa..... | 53 |
| 2.8.5 Demanda química de oxígeno | 53 |
| 2.8.6 Sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos | 53 |
| CAPÍTULO 3 | 55 |
| RESULTADOS Y DISCUSION | 55 |
| 3.1 Pruebas de colonización del medio de soporte en los matraces | 55 |
| 3.2 Evaluación de la producción de Hidrógeno en el reactor empacado con medio de soporte de polietileno..... | 57 |
| 3.3 Contenido de H ₂ | 58 |
| 3.4 Ácidos grasos volátiles..... | 62 |
| 3.5 Consumo de glucosa..... | 65 |

| | |
|--|-----------|
| 3.6 pH..... | 66 |
| 3.7 Evaluación de la producción de Hidrógeno en el reactor empacado con medio de soporte de cerámico | 67 |
| 3.8 Contenido de H ₂ | 68 |
| 3.9 Ácidos grasos volátiles..... | 72 |
| 3.10 Consumo de glucosa..... | 74 |
| 3.11 pH..... | 75 |
| 3.12 Caracterización de los lodos..... | 76 |
| 3.13 Balance de electrones | 76 |
| 3.14 Comparación de los dos sistemas..... | 77 |
| 3.14 Efecto de la alcalinidad sobre la producción de hidrógeno..... | 77 |
| 3.14.1 Producción de H ₂ sin control de pH..... | 77 |
| 3.14.2 pH..... | 78 |
| 3.15 Producción de H ₂ controlando el pH con 1 y 2 g/L CaCO ₃ | 79 |
| 3.15.1 Ácidos grasos volátiles..... | 80 |
| 3.15.2 pH..... | 81 |
| 3.16 Producción de H ₂ controlando el pH con 2 g/L CaCO ₃ | 81 |
| 3.16.1 Ácidos grasos volátiles..... | 82 |
| 3.16.2 pH..... | 82 |
| 3.17 Producción de H ₂ controlando el pH con 3 g/L CaCO ₃ | 83 |
| 3.17.1 Ácidos grasos volátiles..... | 84 |
| 3.17.2 pH..... | 85 |
| 3.18 Comparación de los sistemas | 85 |
| CAPÍTULO 4 | 87 |
| CONCLUSIONES | 87 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 88 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Etapas para la producción de metano de acuerdo a Gujer y Zehnder , 1983

Figura 1.2. Esquema de dos etapas para la producción fermentativa de hidrógeno (Sinha & Pandey , 2011).

Figura 1.3. Producción de hidrógeno por Biofotólisis (Hallenbeck & Ghosh, 2009)

Figura 1.4. Producción de hidrógeno por fotofermentación (Hallenbeck & Ghosh, 2009).

Figura 1.5. Producción fermentativa de hidrógeno (Hallenbeck & Ghosh, 2009)

Figura 1.6. Ruta metabólica de la fermentación de glucosa por *Clostridium* spp. Las transformaciones del sustrato son mostradas por líneas sólidas, la formación de ATP y su utilización es mostrada por líneas punteadas, el flujo de electrones es mostrado por las líneas de guiones. ATP: adenosin trifosfato; G3PDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido; Fd: ferredoxina; PFOR: piruvato Fd oxidoreductasa; NFOR: NDAH Fd Oxirreductasa. CoA: Coenzima A.

Figura 1.7. Transición de una espora inactiva a una forma activa.

Figura 2.1. Soportes para pruebas de colonización. Izq: cerámico Der: HDP

Figura 2.2. Pruebas de colonización

Figura 2.3. Relación de entre absorbancia y concentración de SSV

Figura 3.1. Colonización de empaques

Figura 3.2. Producción de H₂ durante las pruebas de colonización en los matraces.

Figura 3.3. Producción de biogás e hidrógeno en función del tiempo de operación. Experimento A1 y A2

Figura 3.4. Cinética del reactor A, experimento A1 y A2 durante la producción de H₂

Figura 3.5. Ajuste de los datos experimentales por la ecuación de Gompertz

Figura 3.6. Tiempo al cual ocurre la máxima velocidad de producción de H₂ durante los experimentos A1 y A2

Figura 3.7. Productos finales de la fermentación durante la producción de hidrógeno durante los experimentos A1 y A2

Figura 3.8. Producción de H₂ en función del consumo de glucosa en el reactor A1 y A2

Figura 3.9. Comportamiento del pH durante un ciclo de operación en el experimento A1 y A2

Figura 3.10. Producción de biogás e hidrógeno en función del tiempo de operación durante el experimento B1 y B2.

Figura 3.11. Cinética del reactor B. Experimento B1 y B2 durante la producción de H₂

Figura 3.12. Ajuste de los datos experimentales del reactor B por la ecuación de Gompertz

Figura 3.13. Tiempo al cual ocurre la máxima velocidad de producción de hidrógeno durante los experimentos B1 y B2

Figura 3.14. Productos finales de la fermentación durante la producción de H₂ en el experimento B1 y B2.

Figura 3.15. Producción de H₂ en función del consumo de glucosa en el reactor B1 y B2

Figura 3.16. Comportamiento del pH durante un ciclo de operación del experimento B1 y B2.

Figura 3.17. Producción de biogás e H₂ sin alcalinidad. Etapa 1 el arranque, 2 centrifugado uno, 3 aumento de la concentración de sustrato, 4 centrifugado 2

Figura 3.18. Comportamiento del pH durante la producción de H₂ sin control del pH

Figura 3.19. Producción de H₂, pH controlado con 2 g/L CaCO₃

Figura 3.20. Producción de H₂, pH controlado con 1 g/L CaCO₃

Figura 3.21. Productos finales de la fermentación cuando el pH es controlado con 2 g/L de CaCO₃

Figura 3.22. Comportamiento del pH durante la producción de H₂ cuando el pH es controlado con 2 g/L CaCO₃

Figura 3.23. Producción de H₂ cuando se usa 2g/L de CaCO₃ para controlar el pH

Figura 3.24. Productos finales de la fermentación cuando se usa 2g/L CaCO₃

Figura 3.25. Comportamiento del pH durante la producción de H₂. 2g/L CaCO₃

Figura 3.26. Producción de H₂ cuando se usa 3g/L de CaCO₃ para controlar el pH.

Figura 3.27. Productos finales de la fermentación cuando se usa 3g/L CaCO₃

Figura 3.28. Comportamiento del pH durante la producción de H₂ cuando se controla con 3g/L CaCO₃.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Mecanismos de producción de H₂ incluyendo microorganismos, reacciones, y enzimas clave. Ventajas y Desventajas

Tabla 1.2. Reacciones productoras y consumidoras de H₂ en procesos anaerobios

Tabla 1.3. Cultivos puros de bacterias productoras de hidrógeno por fermentación

Tabla 1.4 Comparación entre varios métodos de pretratamiento para enriquecer a las bacterias productoras de hidrógeno de un inóculo mixto

Tabla 1.5. Comparación entre varios sustratos para la producción de hidrógeno por fermentación

Tabla 1.6. Diferentes métodos de pretratamiento del sustrato para lodos activados

Tabla 1.7. Reactores continuos usados para la producción de hidrógeno por fermentación

Tabla 1.8. Efecto de la concentración de nitrógeno en la producción de hidrógeno por fermentación

Tabla 1.9. Efecto de la relación C/N y C/P en la producción de hidrógeno por fermentación

Tabla 1.10. Efecto de la concentración de iones metálicos en la producción de hidrógeno por fermentación

Tabla 1.11. Efecto de la temperatura en la producción de hidrógeno por fermentación

Tabla 1.12. Efecto del pH inicial en la producción de hidrógeno por fermentación en un reactor discontinuo

Tabla 1.13. Efecto del pH en la producción de hidrógeno por fermentación

Tabla 1.14. Características filogénicas y rol de microorganismos coexistiendo con los ya conocidos productores de H₂

Tabla 1.15. Factores que influyen la formación de biopelículas

Tabla 3.1. Parametros de ajuste de la ecuación de Gompertz

Tabla 3.2. Productos principales al final de la fermentación durante la producción de hidrógeno en el reactor A1 y A2

Tabla 3.3. Parametros de ajuste de la ecuación de Gompertz para el reactor B

Tabla 3.4. Productos principales al final de la fermentación durante la producción de hidrógeno durante los experimentos B1 y B2

Tabla 3.5. Balance de electrones

Tabla 3.6. Tabla de resultados de los experimentos A y B

Tabla 3.7. Resultados del efecto de la alcalinidad sobre la producción de hidrógeno

RESUMEN

En esta investigación se evaluó el efecto que tiene el desarrollo de una biopelícula gruesa y una biopelícula delgada sobre la producción de hidrógeno (H_2). La biopelícula gruesa, generada en un soporte poroso, favoreció el crecimiento de microorganismos no productores y/o consumidores de H_2 llevando a bajos rendimientos del mismo. Se encontró que una biopelícula delgada, generada en un soporte plástico fue la adecuada para este tipo de proceso. Se evaluó también la influencia que tiene el tipo de inóculo sobre la producción de H_2 . Para ello se probaron dos inóculos provenientes de reactores tipo UASB donde se tratan aguas residuales de la industria cervecera, de actividad metanogénica diferente. Se encontró que el tipo de inóculo tiene influencia sobre la producción de H_2 , obteniéndose un mayor rendimiento en cuanto a la producción de H_2 cuando se usó el inóculo de menor actividad metanogénica: 0.83 mol/ mol de glucosa y 0.14 mol/mol de glucosa para el de mayor actividad metanogénica. Se evaluó también el efecto de la alcalinidad sobre la producción de H_2 y se encontró que el decaimiento del pH a valores por debajo de 5 llevaba a cero la producción de H_2 en menos de 10 ciclos. Se evaluaron 1, 2 y 3 g/L de $CaCO_3$ para controlar el pH, sin embargo los resultados encontrados no muestran evidencia que la concentración de $CaCO_3$ tenga efecto sobre la producción de H_2 .

INTRODUCCIÓN

Por décadas, el uso y abuso de los combustibles fósiles (líquidos, gases o en forma sólida) ha causado la contaminación del suelo, aire y agua. Recientemente, se han propuesto diversos combustibles alternativos para sustituir a los combustibles fósiles. El hidrógeno (H_2) es uno de esos combustibles alternativos y es reconocido como una de las fuentes de energía del futuro más prometedoras debido a que tiene el contenido de energía más alto por unidad de peso que cualquiera de los combustibles conocidos (ej. la gasolina, gas natural, etanol, etc.) (142 kJ/g o 61000 BTU/lb) (el valor energético de un kg de H_2 es equivalente al de 2.4 kg de metano y contiene 2.75 más energía que los hidrocarburos). Además, es considerado un combustible limpio ya que durante su combustión no desprende, carbón, sulfuro o nitrógeno, causantes de contaminación, sino únicamente agua. Actualmente el H_2 es principalmente producido a partir de combustibles fósiles como el gas natural y nafta. Sin embargo, esta práctica, es una contradicción ambiental ya que se produce un combustible limpio a partir de una fuente contaminante y limitada, de ahí que existe la necesidad de usar otras fuentes y métodos para obtener H_2 de una manera renovable, sostenible y ambientalmente amigable.

En este sentido, la biotecnología a través de la digestión anaerobia puede proveer H_2 de fuentes renovables, abundantes y limpias, como el agua residual o desechos orgánicos (Valdez *et al.*, 2009). El interés en la digestión anaerobia de cultivos energéticos, residuos y desechos orgánicos se ha incrementado en los últimos años debido a la necesidad de reducir las emisiones de los gases que causan el efecto invernadero y facilitar el desarrollo de una de una fuente de energía sostenible (Weiland 2010).

Los procesos para la producción fermentativa de hidrógeno pueden ser divididos en dos categorías: sistemas de biomasa suspendida y sistemas de biomasa inmovilizada.

Los sistemas de biomasa suspendida permiten una mejor transferencia de masa entre los microorganismos y el sustrato, pero presentan dificultad para mantener cantidades suficientes de población de bacterias productoras de hidrógeno en el reactor cuando se trabaja con alta carga hidráulica (o bajo TRH) debido a que el lavado de la biomasa ocurre a TRH corto.

La mayoría de los estudios realizados sobre la producción fermentativa de hidrógeno han sido conducidos en modo de lotes debido a su operación simple y fácil control. Sin embargo, operaciones a gran escala podrían requerir de procesos de producción continua. Estudios previos muestran que el reactor de agitación continua (CSTR) es el tipo de reactor más ampliamente usado en la producción fermentativa de hidrógeno.

En un CSTR convencional, la biomasa está suspendida dentro del reactor y como el tiempo de retención de sólidos es igual al tiempo de residencia hidráulica (TRH) puede ocurrir el lavado de la biomasa, por lo que la concentración de la biomasa en el reactor y por lo tanto la producción de hidrógeno está limitada (Wang & Wan, 2009)

Además de lo anterior, la producción fermentativa de hidrógeno en reactores de tipo CSTR es muy sensible a los cambios en los factores ambientales tales como, pH, TRH, T y compuestos tóxicos.

Así que, como mejorar la retención celular bajo una alta carga hidráulica (o bajo TRH) puede jugar un rol importante para lograr una tasa de producción de hidrógeno eficiente y estable (Wu *et al.*, 2008).

Los reactores de biomasa inmovilizada proveen una alternativa a los reactores de biomasa suspendida, ya que este tipo de reactores son capaces de mantener altas concentraciones de biomasa, por lo que pueden operar a TRH corto (que es apropiado para la producción de hidrógeno) sin que haya lavado de biomasa. La inmovilización de la biomasa puede lograrse a través de la formación de gránulos, biopelículas usando diferentes medios de soporte o biopartículas de gel (Wang & Wan, 2009).

Hasta ahora se ha estudiado la influencia de factores como la temperatura, el pH, el tipo de sustrato, el inóculo, y el tipo de reactor, sin embargo pese a las diferentes investigaciones realizadas para la producción de hidrógeno usando sistemas de biomasa inmovilizada, hasta ahora no ha sido reportada la influencia que tiene el tipo de biopelícula desarrollada sobre el medio de soporte sobre la producción fermentativa de hidrógeno por lo que el objetivo de esta investigación fue estudiar la influencia de una biopelícula delgada y una biopelícula gruesa sobre la producción de hidrógeno. Se evaluó además el efecto del tipo de inóculo y de la alcalinidad del medio sobre la producción de hidrógeno.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la influencia del tipo de biopelícula sobre la producción de hidrógeno en un reactor con biomasa fija empleando dos empaques diferentes.

Objetivos particulares

- Implementar dos reactores con biomasa fija: uno empacado con un medio de soporte plástico y otro empacado con un medio de soporte cerámico.

- Evaluar la producción de H₂ empleando una biopelícula gruesa y una biopelícula delgada.

- Evaluar la producción de H₂ empleando dos inóculos diferentes.

- Evaluar la producción de H₂ bajo diferentes condiciones de alcalinidad del medio.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

Desde el inicio de la historia de la humanidad, el hombre ha usado los combustibles para satisfacer sus necesidades energéticas. Estos han ido evolucionando hacia mejores, más eficientes, más seguros y más limpios ambientalmente, de la madera a la grasa animal, al carbón, al petróleo, al gas natural y ahora al hidrógeno. Claramente se muestra una tendencia hacia el desarrollo de combustibles más ligeros y limpios. Los combustibles fósiles han sido explotados por más de un siglo, lo que ha conducido no solo a serios problemas ambientales sino también al agotamiento de las reservas limitadas de dichos combustibles, cuyos picos máximos está predicho se alcanzarán en 2023 y 2050 para el petróleo y gas natural respectivamente (Brentner *et al.*, 2010), haciendo necesaria la búsqueda de una alternativa de energía limpia. El H₂ es el combustible más prometedor en la sucesión de los combustibles fósiles, con varios beneficios técnicos, socio-económicos y ambientales a su crédito. El H₂ tiene el más alto contenido de energía por unidad de peso que cualquiera de los combustibles conocidos (144 kJ/g). El H₂ es un gas ambientalmente amigable ya que de su combustión resulta únicamente vapor de agua y energía. Estas características hacen del H₂ un candidato ideal para reemplazar a los combustibles fósiles. El H₂ ha sido aceptado universalmente como un recurso de energía renovable ambientalmente seguro y como la alternativa más adecuada a los combustibles fósiles que no daña el medio ambiente.

La demanda global de energía se está incrementando rápidamente, y alrededor del 88% de esta demanda es satisfecha por combustibles fósiles. Distintos escenarios han mostrado que esta demanda de energía se incrementará durante este siglo en un factor de 2 ó 3. Al mismo tiempo, las concentraciones de gases causantes del efecto invernadero en la atmósfera se están incrementado rápidamente, como las emisiones de CO₂, derivadas del uso de combustibles fósiles. Para reducir el calentamiento global relacionado con dichas emisiones y los impactos por el cambio climático, es necesario que las emisiones sean reducidas a menos de la mitad de los niveles de emisión global de 1990. Para esto se ha pensado en el H₂ como una de las soluciones más prometedoras. (Weiland, 2010)

Actualmente el 40% del H₂ es producido a partir de los gases naturales, 30% de aceites pesados y nafta, 18% del carbón, 4% por medio de electrólisis y alrededor del 1% de biomasa. Actualmente, los procesos de producción biológica de H₂ a nivel laboratorio están en auge debido a dos razones principalmente: el uso de recursos de energía renovable y porque dichos procesos se llevan a cabo a temperatura y presión atmosférica (Sinha & Pandey, 2011).

El interés en el biohidrógeno empezó a ganar prominencia en los 90s cuando se hizo evidente que la contaminación atmosférica por la combustión de combustibles fósiles no solo tenía efectos en la salud localmente, sino que también puede provocar cambios climáticos significantes globalmente. Como resultado, algunos gobiernos empezaron a invertir en la producción biológica de hidrógeno, particularmente los gobiernos de Alemania, Estados Unidos y Japón y con menor inversión en algunas otras ciudades. Actualmente, diferentes ciudades han decidido invertir en esta investigación en la búsqueda de una fuente renovable de energía. La realización de procesos prácticos para la producción de hidrógeno podría resultar en una importante fuente biológica de energía sostenible y renovable, sin emisiones de gases de efecto invernadero o contaminación ambiental. Sin embargo, el desarrollo de procesos prácticos requerirá avances significativos en desarrollo científico y tecnológico, y relativamente tiempos largos (>10 años). Para que el H₂ sea renovable, debe provenir de fuentes renovables.

Los procesos para la producción biológica de hidrógeno pueden ser divididos, en términos generales, en dos grupos distintos: uno dependiente de la luz y el otro independiente. Los procesos que se llevan a

cabo mediante la luz son biofotólisis directa o indirecta y fotofermentación mientras que la fermentación oscura es un proceso independiente de la disponibilidad de luz (Kotay & Das, 2008).

Aunque la producción fotosintética de H_2 es un proceso teóricamente perfecto con la transformación de la energía solar en hidrógeno por bacterias fotosintéticas, aplicarlo a la práctica es difícil debido a la baja eficiencia de utilización de la luz y dificultades en el diseño del reactor. Sin embargo, la producción fermentativa de hidrógeno tiene las ventajas de una tasa rápida de producción de hidrógeno y su operación simple. Además, puede utilizar varios desechos orgánicos como sustratos. Entonces comparada con la producción fotosintética, la producción fermentativa es más viable y por lo tanto la más ampliamente usada. Además, es de gran significancia producir hidrógeno a partir de desechos orgánicos a través de la fermentación porque no solo se trata los desechos orgánicos, sino que también se produce energía limpia. Es por eso que la producción fermentativa de hidrógeno ha ganado tanto interés en los últimos años (Wang & Wan, 2009).

Hasta hoy únicamente se ha logrado una eficiencia del 15% en los procesos de fermentación. Aun cuando la fermentación es rápida, aun no es un proceso eficiente en la conversión de la energía contenida en la biomasa a hidrógeno. El objetivo es entonces incrementar el rendimiento de hidrógeno a alrededor del 85%. Mientras que el proceso de fermentación para la producción de hidrógeno ha sido demostrado en laboratorio, los rendimientos han sido bajos y es incierto si esta tecnología puede ser desarrollada para proveer altos rendimientos de hidrógeno y convertirse económicamente competitivo con la gasolina o con las ya establecidas rutas de producción de hidrógeno.

“The Global Hydrogen Vision” prevee al hidrógeno como un recurso de energía doméstica flexible, seguro y asequible que será usado en todos los sectores de la economía y en todas las regiones del mundo. El hidrógeno se convertirá en la “opción de energía limpia” del mundo, uniéndose a la electricidad como portador de energía primaria y proveyendo los fundamentos para el establecimiento de un sistema de energía sostenible globalmente (Kotay & Das, 2008)

1.1 Digestion Anaerobia

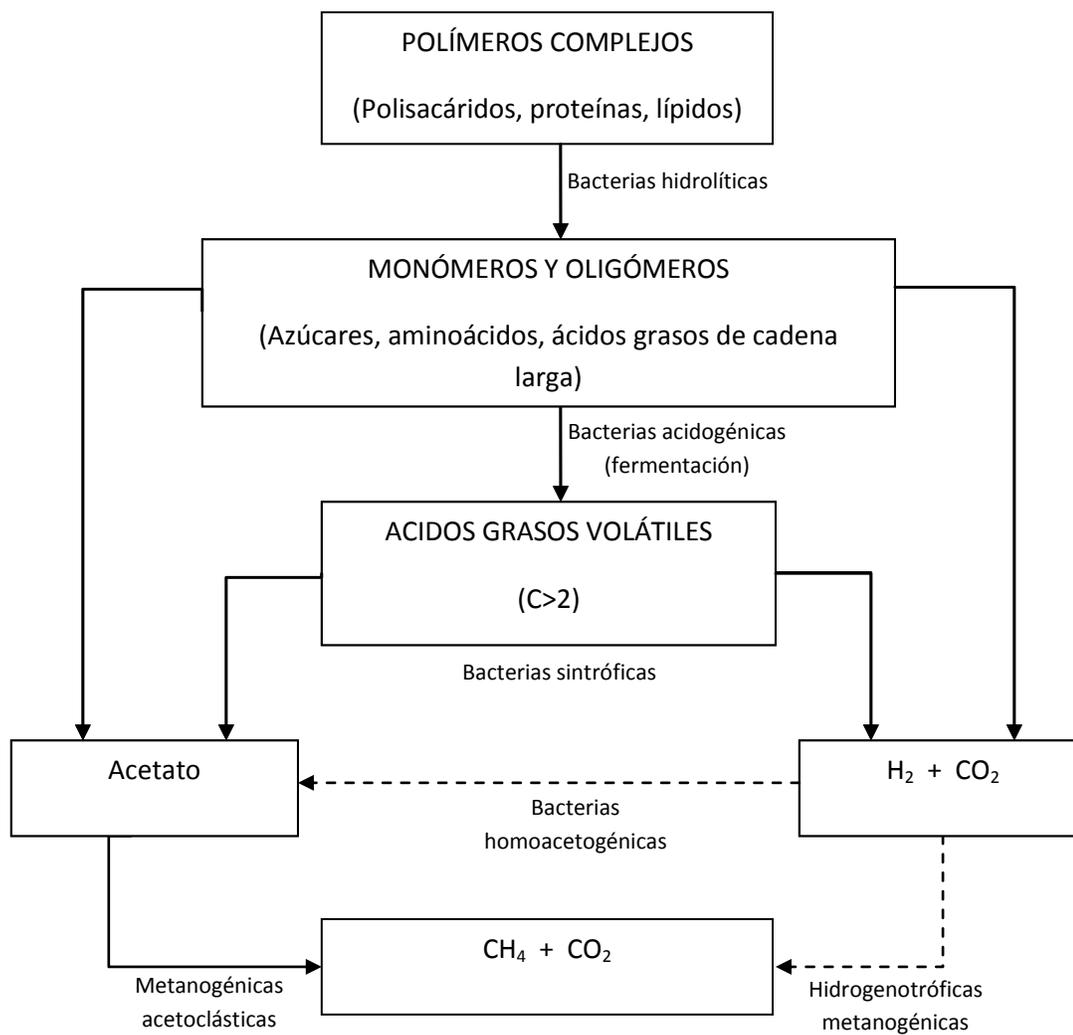


Figura 1.1. Etapas para la producción de metano de acuerdo a Gunjer y Zehnder, 1983

---> Reacciones que consumen hidrógeno (Valdez & Poggi 2009)

El proceso de la digestión anaerobia es un proceso complejo, dicho proceso puede ser dividido en cuatro fases: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis/deshidrogenación y metanogénesis (Figura 1.1). Los pasos individuales de degradación son llevados a cabo por diferentes consorcios de microorganismos, los cuales en parte están interrelacionados sintróficamente. Los microorganismos encargados de la fermentación e hidrólisis son los responsables del ataque inicial a los polímeros y monómeros y producir principalmente acetato e hidrógeno y cantidades variantes de ácidos grasos volátiles como propionato y butirato. Los microorganismos hidrolíticos excretan enzimas hidrolíticas, como la celulasa, xilanasa, amilasa, lipasa, y proteasa. En la hidrólisis y fermentación de la materia orgánica participa un consorcio complejo de microorganismos, la mayoría de las bacterias son anaerobias estrictas como las bacteriocidas, *Clostridia*, y *Bifidobacteria*, además de algunas facultativas anaerobias como las *Streptococcus* y *Enterobacter*. (Weiland, 2010). A continuación una explicación más amplia.

1.1.1 Hidrólisis y Acidogénesis

Aquí las bacterias fermentativas se ocupan de la hidrólisis de los polímeros orgánicos y de los lípidos para formar elementos estructurales básicos como monosacáridos, aminoácidos, ácidos grasos, alcoholes, y posteriormente ácidos grasos volátiles de cadena corta, así como hidrógeno y dióxido de carbono.

1.1.2 Acetogénesis

En esta etapa, los productos intermedios de la fermentación, son convertidos a acetato, hidrógeno y dióxido de carbono por bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno (OHPA). Estas bacterias son inhibidas por el hidrógeno que producen, por lo que es necesario que éste no se acumule en el medio. Debido a esto, las bacterias OHPA mantienen una estrecha relación con las bacterias que remueven el hidrógeno, como las metanogénicas.

Las bacterias consumidoras de hidrógeno son las encargadas de mantener baja la presión parcial del hidrógeno en el sistema, de otra manera los ácidos grasos volátiles, se acumularían en el sistema disminuyendo el pH, lo que inhibiría la actividad de las bacterias productoras de hidrógeno.

En el sistema se pueden desarrollar bacterias homoacetogénicas capaces de transformar el hidrógeno, dióxido de carbono y azúcares simples como la glucosa, a acetato únicamente, disminuyendo así el rendimiento en la producción de hidrógeno.

1.1.3 Metanogénesis

Por último, para una degradación completa de la materia orgánica, el consumo de los ácidos orgánicos e H_2 por microorganismos metanogénicos acetoclásticos/hidrógenotróficos produciendo CH_4 y CO_2 es esencial. Además cuando están presentes sulfatos o nitratos, las bacterias sulfatorreductoras (SRB) y nitratorreductoras (NRB) son capaces de usar el H_2 como donador de electrones produciendo sulfuros y amoníaco, respectivamente.

De esta manera, el H_2 es un intermediario clave consumido principalmente por microorganismos metanogénicos, NRB, SRB y homoacetogénicos. El consumo de H_2 permite que las reacciones bioquímicas llevadas a cabo por bacterias sintróficas, se conviertan en exergónicas permitiendo a los sintrofos producir H_2 adicional a partir de los ácidos orgánicos. Esta asociación obligatoria entre productores y consumidores de H_2 es llamada sintrofia. En consecuencia, la concentración de H_2 y la actividad de los consumidores del mismo pueden regular las rutas de la fermentación. Debido al rápido consumo del H_2 , su concentración usualmente es extremadamente baja, y los microorganismos tienen que competir por él. Por eso, el establecimiento de un tipo de consumidor de H_2 depende principalmente del tipo de inóculo, la concentración de H_2 , fuente de carbono, la solubilidad del aceptor de electrones y en la capacidad de utilizar concentraciones traza de H_2 . (Valdez & Poggi, 2009).

Para la producción de hidrógeno es necesario entonces darle tratamiento previo al inóculo a fin de eliminar las bacterias metanogénicas y todas aquellas que consumen el H_2 y además proveer las condiciones apropiadas durante la operación del proceso para evitar que esta etapa, donde el hidrógeno es consumido, se lleve a cabo.

Pese a lo anterior y después de optimizar todos los factores físicos para la producción fermentativa de hidrógeno, no se podrían producir 12 moles de H_2 (disponibles teóricamente) a partir de la oxidación completa de un mol de glucosa. Y además, la oxidación completa de glucosa a H_2 y CO_2 nunca será posible debido a que la reacción es termodinámicamente no favorable (ec. 1.1).

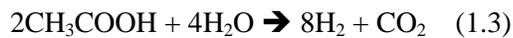


Para superar esta limitación termodinámica se han propuesto sistemas combinados de producción de hidrógeno. La Fermentación oscura seguida de la producción de hidrógeno a través de fotofermentación es uno de ellos (Figura 1.2). En este tipo de sistemas los productos intermedios de la fermentación oscura como los ácidos grasos de cadena corta (acético, butírico, etc.) son convertidos a hidrógeno a través de las bacterias fotosintéticas. El proceso completo, entonces, incluye dos etapas representadas como sigue:

Etapla 1: Fermentación oscura por bacterias anaerobias facultativas (ec.1.2)



Etapla 2. Fotofermentación por bacterias fotosintéticas (ec.1.3)



Entonces, usando glucosa como el único sustrato en un sistema combinado para la producción de hidrógeno se esperarían 12 moles de hidrógeno por cada mol de glucosa consumido, cuando el ácido acético es el mayor subproducto en la fermentación oscura.

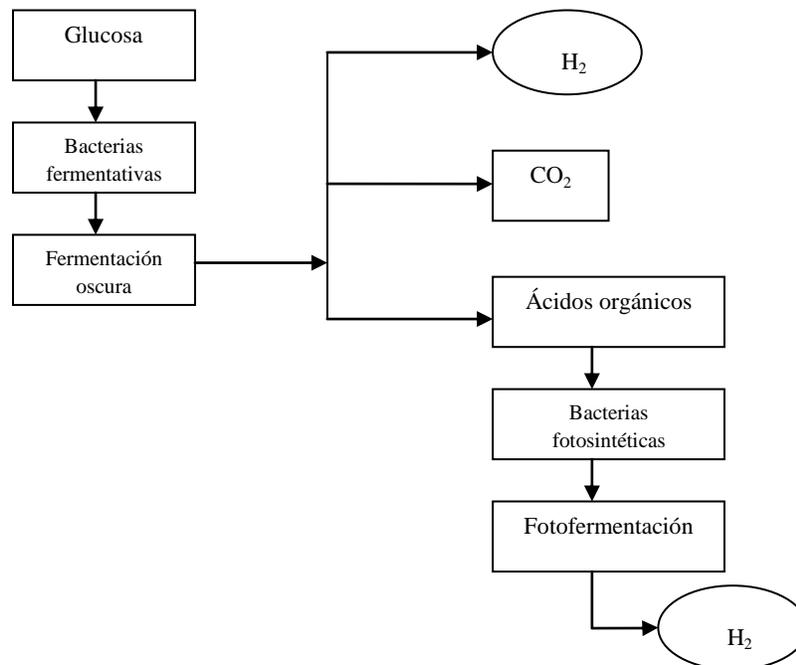


Figura 1.2. Esquema de dos etapas para la producción fermentativa de hidrógeno (Sinha & Pandey, 2011).

Es importante aclarar que este trabajo está enfocado en la producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura (primera etapa), la cual no busca disminuir la materia orgánica, sino que la transforma en compuestos (ej: ácidos grasos de cadena corta) más simples que tendrán que ser tratados en una segunda etapa como la mencionada anteriormente.

1.2 Métodos de producción de hidrógeno

Existen cuatro mecanismos básicos para la producción biológica de hidrógeno: Biofotólisis, Biofotólisis indirecta, Fotofermentación y Fermentación. La tabla 1.1 presenta un resumen de estos mecanismos incluyendo microorganismos, reacciones, enzimas clave así como los pro y contra. La Biofotólisis se asocia con el tipo de fotosíntesis realizada por las plantas ya que utiliza la energía de la luz para separar el agua y formar hidrógeno, generalmente es llevada a cabo por algas verdes bajo condiciones anaerobias. La biofotólisis indirecta típicamente involucra cianobacterias que hacen uso de la energía de los carbohidratos de la fotosíntesis para generar hidrógeno a partir del agua. La fotofermentación es llevada a cabo por bacterias purpuras no sulfurosas (PNSB) que utilizan la energía de la luz para transformar ácidos orgánicos en hidrógeno y dióxido de carbono. La fermentación oscura (independiente de la luz) es un proceso en el cual bacterias anaerobias descomponen los carbohidratos formando hidrógeno (Brentner, *et al.*, 2010).

Los métodos de producción biológica de hidrógeno dependen fundamentalmente de la presencia de enzimas que metabolizan hidrógeno. Hipotéticamente es posible que la cantidad o actividad inherente de estas enzimas pueda limitar el proceso. Las enzimas productoras de hidrógeno catalizan la que se podría decir la reacción química más simple (ec.1.4):



Actualmente se conocen tres enzimas productoras de hidrógeno: Nitrogenasa, Fe Hidrogenasa y Ni-Fe Hidrogenasa (Sinha & Pandey, 2011). Todos estos métodos tienen aspectos positivos y negativos, así como barreras técnicas que tienen que ser superadas antes de que puedan convertirse en prácticos (Hallenbeck & Ghosh, 2009).

Estos métodos pueden ser usados de forma combinada para obtener mayores rendimientos. Por ejemplo, la fotofermentación puede ser usada para producir hidrógeno utilizando energía de la luz para transformar los ácidos grasos producidos durante la fermentación.

La eficiencia de conversión del sustrato (rendimiento de hidrógeno) está basada en la fracción de moles de hidrógeno del total de moles teóricos disponibles del donador de electrones:

$$\text{Eficiencia de conversión del sustrato (\%)} = \frac{\text{moles de } \text{H}_2 \text{ producidos}}{\text{moles teóricos de } \text{H}_2 \text{ por mol de sustrato}} \times 100\%$$

Tabla 1.1. Mecanismos de producción de H₂ incluyendo microorganismos, reacciones, y enzimas clave. Ventajas y Desventajas

| Mecanismo | Organismos | Reacción | Enzimas Clave | Ventajas | Desventajas |
|------------------------|----------------------------------|--|---------------------|---|--|
| Biofotólisis | Algas verdes, cianobacterias | $2\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{luz}} 2\text{H}_2 + \text{O}_2$ | [FeFe]- Hidrogenasa | H ₂ producido a partir de luz solar y agua. | Sensibilidad al O ₂ , reactores con bajo aprovechamiento de la luz, baja eficiencia en la producción de H ₂ |
| Biofotólisis indirecta | Cianobacterias | $6\text{H}_2\text{O} + 6\text{CO}_2 \xrightarrow{\text{luz}} 2\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{luz}} 12\text{H}_2 + 6\text{CO}_2$ | [NiFe]-Hidrogenasa | Heterocistos separan la producción de H ₂ de la de O ₂ en los microorganismos. | Se requiere de mejores diseños de reactores para el aprovechamiento de la luz. |
| Fotofermentación | Bacterias púrpuras no sulfuradas | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{luz}} 12\text{H}_2 + 6\text{CO}_2$ | Nitrogenasa | Utiliza energía de la luz solar para convertir ácidos orgánicos de cadena corta a H ₂ y CO ₂ sin la generación de subproductos. | Baja eficiencia en el aprovechamiento de la luz |
| Fermentación | Bacterias anaerobias | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COOH} + 4\text{H}_2 + 2\text{CO}_2$ | Hidrogenasas | Altas velocidades de producción de H ₂ , utiliza aguas residuales como sustrato, usa consorcios microbianos. | Muchos subproductos, se requiere de separación del biogás para recuperar el H ₂ , metabolización incompleta del sustrato/bajos rendimientos |

(Brentner, *et al.*2010)

La ecuación anterior no es aplicable a los procesos fotoautótrofos donde el agua es el donador de electrones. Para los procesos que utilizan la energía de la luz se calcula la eficiencia fotoquímica, la cual está dada por la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia fotoquímica (\%)} = \frac{\text{velocidad de producción de moles de H}_2 \times \text{Contenido de energía por mol de H}_2}{\text{Energía de la luz incidente}}$$

1.2.1 Biofotólisis

La Biofotólisis o la producción de hidrógeno fotoautótrofa, es la producción de hidrógeno a partir del agua usando la energía de la luz absorbida. La ventaja de las biofotólisis es que el donador de electrones para la producción de hidrógeno es el agua, sin la necesidad de agregar sustratos orgánicos, requiriendo únicamente la luz solar, dióxido de carbono y nutrientes para que las algas verdes y cianobacterias que llevan a cabo este proceso a través de la enzima hidrogenasa, se desarrollen. La energía de la luz es absorbida por los fotosistemas I y II de las microalgas, excitando los centros de reacción que transfieren energía a través de una cadena de transporte de electrones, que reduce la ferredoxina, la cual provee de electrones a la enzima hidrogenasa (Figura 1.3). Es pensado que las hidrogenasas existen para proveer de una salida al exceso de electrones cuando el componente de la fijación del dióxido de carbono de la cadena fotosintética se encuentra comprometido bajo condiciones especiales (medio anaerobio, pH muy bajo, baja intensidad de luz). Las algas verdes poseen [FeFe]-hidrogenasas, que son consideradas como las eficientes catalíticamente, de las hidrogenasas. Las cianobacterias emplean diferentes hidrogenasas, principalmente las [NiFe]-hidrogenasas.

Durante la biofotólisis, 1 mol de O₂ es liberado por cada mol de H₂ producido. El O₂ actúa como represor transcripcional, como inhibidor de ensamble y como inhibidor irreversible de la actividad catalítica de las [FeFe]-hidrogenasas. Entonces para tener una eficiente producción de H₂ es necesario que el O₂ producido sea removido del medio para provocar condiciones anóxicas, ideales para la actividad de las hidrogenasas.

En este proceso existen tres problemas principales que necesitan ser superados para mejorar los sistemas de biofotólisis: 1) bajas eficiencias fotoquímicas, 2) la sensibilidad de las hidrogenasas al O₂, y 3) la competencia por el reductante de la ferredoxina entre las hidrogenasas y otras funciones celulares. El objetivo es al menos 10% en la eficiencia fotoquímica, sin embargo las eficiencias actuales están lejos de ese valor debido a las limitaciones en la penetración de la luz a los fotobiorreactores y la transferencia de la energía de la luz entre las células (Brentner *et al.*, 2010).

Ventajas

Sustrato abundante: agua, productos simples: H₂ y CO₂

Desventajas

Baja eficiencia de conversión de la luz, sensibilidad de las hidrogenasas al O₂, se requiere de fotobiorreactores caros impermeables al H₂.

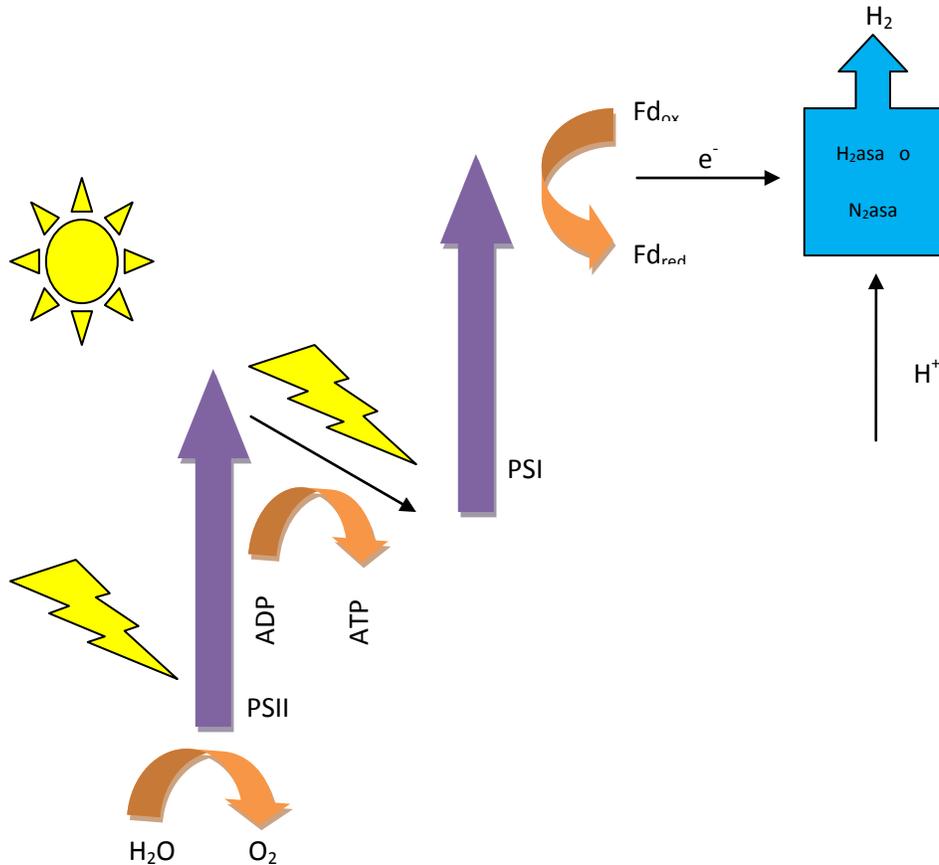


Figura 1.3. Producción de hidrógeno por Biofotólisis (Hallenbeck & Ghosh, 2009)

1.2.2 Biofotólisis Indirecta

La biofotólisis indirecta separa los procesos fotosintéticos de la producción de hidrógeno, ya sea temporalmente o espacialmente. La biofotólisis indirecta evita los problemas asociados con la sensibilidad enzimática al oxígeno. En la biofotólisis indirecta, las células utilizan las reservas de almidón de actividades fotosintéticas previas para proveer la energía necesaria para producir H₂ a través de la fermentación. La biofotólisis indirecta comparte muchas de las ventajas de la biofotólisis directa ya que el agua sigue siendo el donador de electrones y el carbón inorgánico la fuente de carbón de este proceso.

Las cianobacterias filamentosas como las del género *Anabaena*, separa espacialmente los dos procesos formando heterocistos. Los heterocistos son células especializadas para la fijación del nitrógeno que se encuentran entre cadenas de células fotosintéticas. Estas células son alimentadas por células fotosintéticas adyacentes, así que no necesitan su propia maquinaria fotosintética, lo cual podría impedir la función de las enzimas nitrogenasas que catalizan la fijación del nitrógeno, sensibles al O₂. Las nitrogenasas también catalizan la formación de H₂ como un producto obligatorio de la fijación del nitrógeno de acuerdo a la siguiente reacción (ec.1.5) (Brentner *et al.*, 2010):



1.2.3 Fotofermentación

La fotofermentación o la producción de hidrógeno fotoheterotrófica, es un mecanismo encontrado en un diverso grupo de bacterias fotosintéticas y bien caracterizado en las bacterias púrpuras no sulfurosas (PNSB). Este mecanismo es primariamente mediado por la enzima nitrogenasa. En comparación con las cianobacterias y algas las PNSB tienen la ventaja de que únicamente existen bajo condiciones anaerobias y no tienen que separar su fase de crecimiento de sus actividades productoras de H₂.

En este proceso las PNSB, que llevan a cabo la fotosíntesis anaerobia, usan la energía de la luz solar capturada para producir ATP y electrones de alta energía (a través del flujo inverso de electrones) que reducen la ferredoxina. El ATP y la ferredoxina logran la reducción de los protones a H₂ por medio de las nitrogenasas. Las PNSB no pueden obtener electrones del agua, es por eso que usan compuestos orgánicos, usualmente ácidos orgánicos, como sustratos (Figura 1.4) Las PNSB pueden potencialmente desviar el 100% de los electrones de un sustrato orgánico hacia la producción de hidrógeno. Esta es una ventaja considerable sobre las bacterias fermentativas, las cuales teóricamente pueden aprovechar 1/3 de los electrones (en la práctica es alrededor del 15%) contenidos en desechos con alto contenido de carbohidratos, para la producción de hidrógeno. La fotofermentación puede mejorar la eficiencia global degradando los subproductos de la fermentación y producir biogás de alta pureza con beneficios ambientales, económicos y energéticos.

Cabe mencionar también que algunas PNSB son capaces de producir H₂ a través de una reacción de intercambio, donde el CO reacciona con el agua, produciendo CO₂ y H₂ (ec.1.6) (Brentner *et al.* 2010)

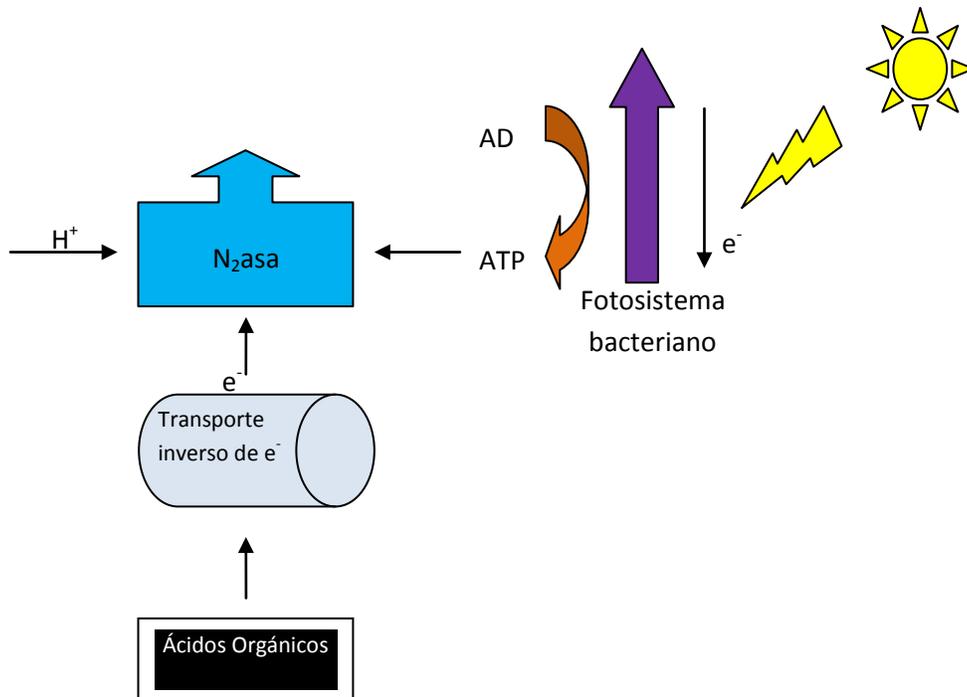


Figura 1.4. Producción de hidrógeno por fotofermentación (Hallenbeck & Ghosh, 2009).

1.2.4 Fermentación

En este proceso se pueden usar una variedad de microorganismos para romper los sustratos ricos en carbohidratos a hidrógeno y otros productos, principalmente ácidos (láctico, acético, butírico, etc) y alcoholes (etanol, butano, etc.). Las cantidades de estos productos pueden ser diferentes dependiendo de la composición del consorcio microbiano desarrollado en el reactor, el estado de oxidación del sustrato y las condiciones ambientales (pH, presión parcial del H_2 , T, TRH, etc.)(Figura 1.5).

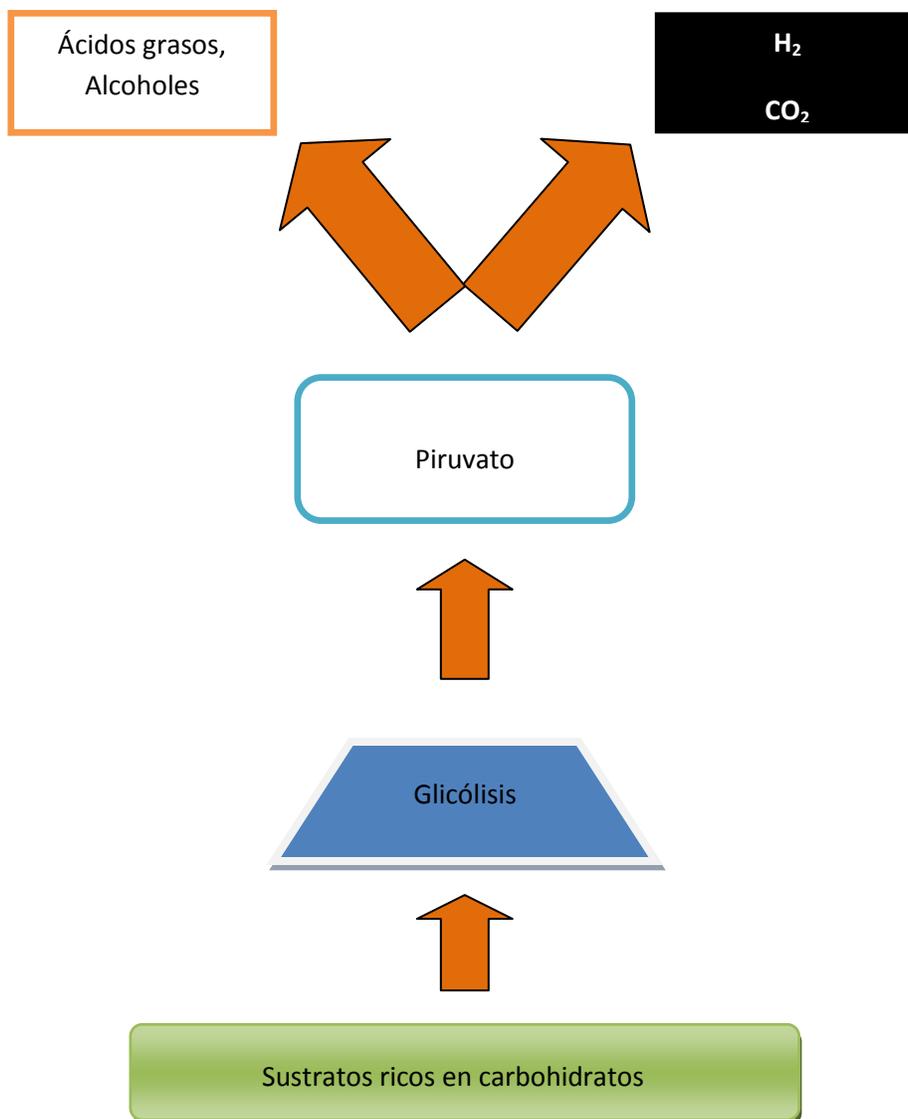


Figura 1.5.Producción fermentativa de hidrógeno (Hallenbeck & Ghosh, 2009)

Los lodos productores de H_2 casi siempre están dominados por las especies *Clostridia* (Fang *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2003). Los miembros de este género desarrollan esporas resistentes al calor, esto permite que los lodos (inóculo) sean tratados térmicamente para remover a los microorganismos

metanogénicos u otras bacterias que interfieren con la producción de H₂ por utilizar el H₂ que está siendo producido. Esta es una de las ventajas de la producción fermentativa de H₂ ya que las comunidades de microorganismos son generalmente más estables y adaptables a los cambios en el ambiente que los cultivos puros, haciéndolos más adecuados para una operación continua, por ejemplo. Los cultivos puros son más ideales para tareas específicas e ingeniería metabólica.

La producción fermentativa de hidrógeno está caracterizada por altas velocidades de producción pero bajas eficiencias en la conversión del sustrato. Los bajos rendimientos de H₂ son debidos a que los carbohidratos no son completamente metabolizados, llevando a una conversión incompleta a H₂ y CO₂ y la generación de subproductos, como ácidos orgánicos. El biogás producido a través de la fermentación contiene una fracción menor de H₂ que el producido por fotofermentación o biofotólisis, es por eso que aquí se requerirá un paso de separación para recuperar el H₂. Para lograr la producción de H₂ es necesario mantener el potencial redox necesario para la ferredoxina y NADH que llevan a cabo la reducción de H₂ y esto se logra cuando las presiones parciales de H₂ están en menos de 0.3 atm y 6×10^{-4} atm, respectivamente. Entonces es necesario que este tipo de sistema cuente con un mecanismo para liberación de la presión, como burbujeo con un gas inerte o agitación.

Se han diseñado diferentes configuraciones de biorreactores para mejorar la producción de hidrógeno por fermentación a través de fomentar la concentración de la biomasa y la eficiencia de conversión del sustrato. Los reactores tipo discontinuo son los más usados en experimentos a nivel laboratorio, sin embargo estos no son prácticos para aplicaciones industriales donde podría requerirse de ciclos de producción más largos.

La mayoría de los estudios de laboratorio hasta hoy realizados han utilizado la glucosa como sustrato modelo para la producción de H₂. La ruta metabólica de *Clostridium* spp para producir hidrógeno vía fermentación de glucosa, ha sido uno de los más estudiados y por lo tanto el mejor entendido (Figura 1.6).

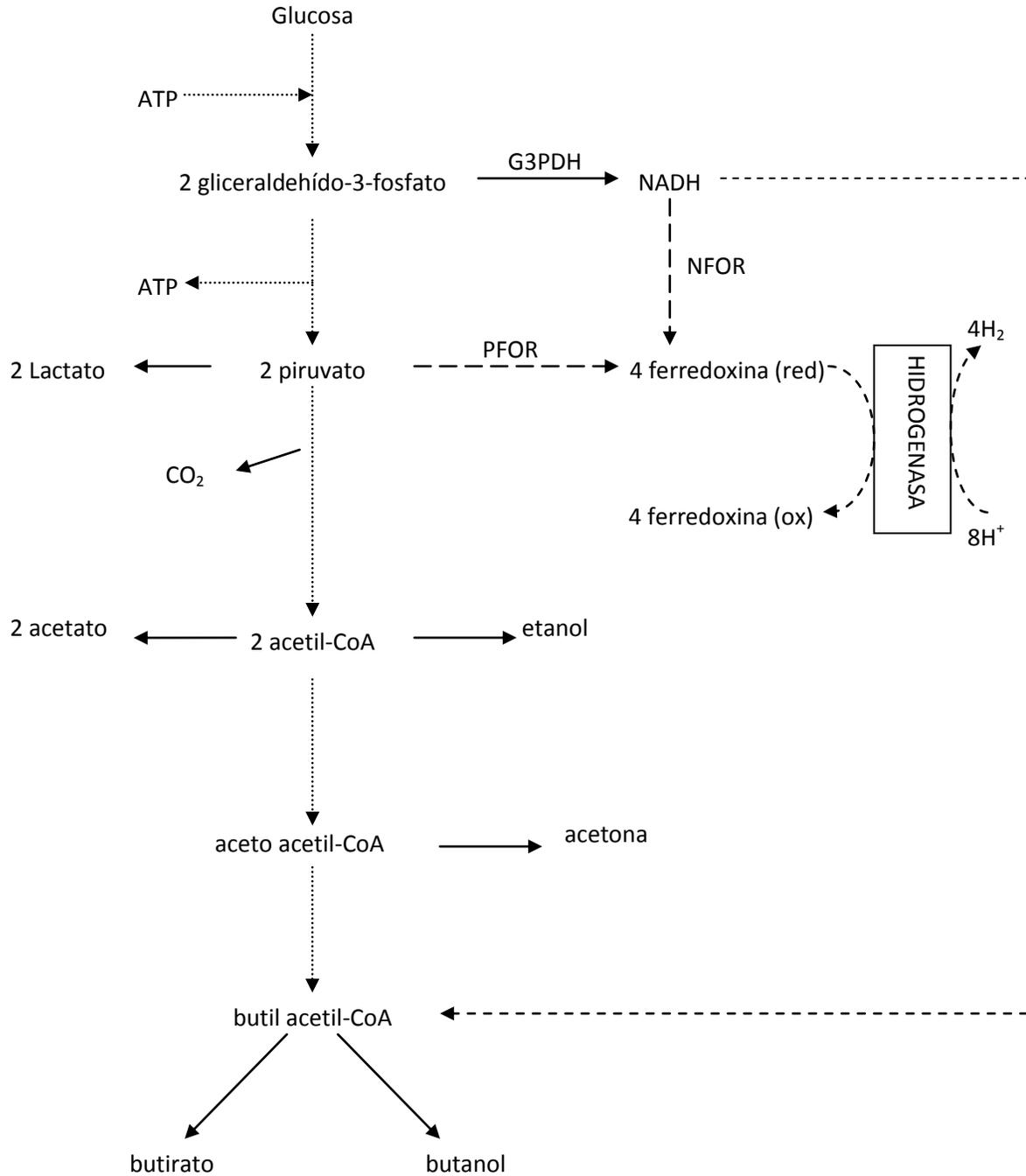


Figura 1.6. Ruta metabólica de la fermentación de glucosa por *Clostridium* spp. Las transformaciones del sustrato son mostradas por líneas sólidas, la formación de ATP y su utilización es mostrada por líneas punteadas, el flujo de electrones es mostrado por las líneas de guiones. ATP: adenosin trifosfato; G3PDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido; Fd: ferredoxina; PFOR: piruvato Fd oxidoreductasa; NFOR: NDAH Fd Oxirreductasa. CoA: Coenzima A. (Sinha & Pandey, 2011)

El piruvato es convertido a acetyl-CoA y CO₂ a través de la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR). La oxidación del piruvato necesita de la ferredoxina la cual a su vez transfiere electrones a los protones, reduciendo de este modo los protones generando H₂. La transferencia de electrones de la ferredoxina a los protones es catalizada por la enzima hidrogenasa. El proceso completo resulta en una producción máxima de 2 moles de H₂ por mol de glucosa metabolizado.

Otros 2 moles de H₂ pueden ser producidos a través de la oxidación del NADH producido en la glucólisis. El NADH se oxida por la transferencia de electrones a la ferredoxina (fd). La reducción de la ferredoxina es llevada a cabo por la NADH: ferredoxina oxidoreductasa (NFOR). La oxidación de la fd reducida por la enzima hidrogenasa resulta en la producción de H₂.

De este modo, se puede obtener, de manera global, 4 moles de H₂ por mol de glucosa. Sin embargo en la práctica se obtienen valores más bajos debido a que la oxidación del NADH por NFOR es inhibida bajo ciertas condiciones (requiere de presiones parciales de H₂ muy bajas, < 60 Pa)

Las reacciones involucradas en la producción de H₂ por microorganismos anaerobios estrictos son (ec. 1.7, 1.8, 1.9):



La producción de H₂ depende de los productos formados como: acetato, butirato, acetona, lactato o etanol. La producción teórica de H₂ más alta puede ser alcanzada únicamente cuando la acetyl-CoA es metabolizada a la forma ya sea de acetona (ec.1.11) o acetato (ec.1.10) como producto final de la fermentación.



Cuando el butirato es el producto final de la fermentación la producción máxima teórica de H₂ es de 2 moles de H₂ por mol de glucosa (ec 1.12):



Cuando los alcoholes son los productos finales de la fermentación se obtiene la producción más baja de H₂ debido a que los alcoholes contienen átomos adicionales de hidrógeno que no pueden ser convertidos a hidrógeno gas (Sinha & Pandey, 2011).

La tabla 1.2 presenta de manera general las reacciones de producción y consumo de H₂ en un proceso anaerobio. En dicha tabla se puede ver el valor de la energía libre de Gibbs, ésta da la condición de equilibrio y de espontaneidad para una reacción química (a presión y temperatura constantes). Un valor negativo de la energía libre de Gibbs indica que el proceso o reacción química ocurrirá espontáneamente en la dirección dada, con base en esto se puede observar que las reacciones de producción de hidrógeno se dan de manera espontánea y natural, obteniendo como subproductos la formación de ácido butírico y acético.

Tabla 1.2. Reacciones productoras y consumidoras de H₂ en procesos anaerobios

| Tipo de reacción | Reacción | Energía libre de Gibbs () | |
|---|---|----------------------------|-----------------------|
| | | $\Delta G^{\circ(a)}$ | $\Delta G^{\circ(b)}$ |
| Fermentación | $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2H_2 + \text{butirato} + 2HCO_3^- + 3H^+$ | -135 | -284 |
| Fermentación | $C_6H_{12}O_6 + 4H_2O \rightarrow 4H_2 + 2\text{acetato} + 2HCO_3^- + 4H^+$ | -207 | -319 |
| Oxidación anaerobia (sintrofia) | $\text{Butirato} + 2H_2O \rightarrow 2H_2 + 2\text{acetato} + H^+$ | +48.2 | -17.6 |
| Oxidación anaerobia (sintrofia) | $\text{Propionato} + 3H_2O \rightarrow 3H_2 + \text{acetato} + HCO_3^- + H^+$ | +76.2 | -5.5 |
| Metanogénesis hidrógenotrófica | $4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$ | -136 | -3.2 |
| Acetogénesis a partir de CO ₂ y H ₂ | $4H_2 + 2 HCO_3^- + H^+ \rightarrow \text{acetato} + 4H_2O$ | -105 | -7.1 |
| Sulfatorreducción | $4H_2 + SO_4^{2-} \rightarrow HS^- + 3H_2O + OH^-$ | NA | -165 |

(a) Condiciones estándar (b) Condiciones prevalecientes en ambientes anaerobios

(Valdez & Poggi, 2009)

En la mayoría de los ambientes anaerobios, el consumo de H₂ se lleva a cabo también de manera espontánea por los diferentes grupos microbianos (bacterias metanogénicas, acetogénicas y sulfatorreductoras). Sin embargo, en un sistema productor de H₂ lo que se busca es lograr la acumulación de H₂, y para ello debe evitarse que existan concentraciones de nitratos y sulfatos en el influente, ya que en la medida que estos compuestos se incorporen, la eficiencia del sistema disminuye debido a que asumen la función de aceptores finales de la cadena de electrones.

1.3 Factores que afectan la producción de hidrógeno

La producción de hidrógeno por fermentación es un proceso muy complejo e influenciado por diferentes factores como lo son el inóculo, sustrato, el tipo de reactor, minerales, temperatura, pH entre otros. Los efectos de estos factores sobre la producción fermentativa de H₂ han sido reportados por un gran número de estudios alrededor del mundo en los últimos años (Wang & Wan, 2009). A continuación se presenta uno a uno.

1.3.1 Inóculo

Inóculo puro

Una gran cantidad de inóculos puros han sido usados para producir hidrógeno a partir de varios sustratos. La tabla 1.3 resume varios estudios usando cultivos puros para la producción de hidrógeno por fermentación. Como se muestra, el género, *Clostridium* y *Enterobacter* fueron los más usados como inóculo para la producción de hidrógeno por fermentación. La mayoría de los estudios realizados con cultivos puros fueron realizados en reactores tipo discontinuo y usando glucosa como sustrato. Sin embargo es más deseable producir hidrógeno a partir de desechos orgánicos usando cultivos puros de manera continua ya que éste sería más viable para ser instalado en la industria.

Cultivo mixto

Las bacterias capaces de producir hidrógeno existen ampliamente en ambientes naturales como suelos, lodos de aguas residuales, composta, etc. (Cheong *et al.*, 2006). Por lo tanto estos materiales pueden ser usados como inóculos para la producción de hidrógeno por fermentación. Actualmente los cultivos mixtos de bacterias de lodos anaerobios, lodos municipales, composta y suelos, han sido ampliamente usados como inóculos para la producción de hidrógeno por fermentación. Los procesos de producción de hidrógeno que emplean cultivos mixtos son más prácticos que aquellos que usan cultivos puros, debido a que son más fáciles de controlar. Sin embargo en un proceso de producción de hidrógeno por fermentación que usa un cultivo mixto, el hidrógeno producido puede ser consumido por bacterias consumidoras de hidrógeno, pero si el medio es tratado bajo condiciones severas, las bacterias productoras de hidrógeno tienen mejor oportunidad de sobrevivir que aquellas que consumen el hidrógeno. Así que para asegurar la producción de hidrógeno por medio de un proceso de fermentación, los cultivos mixtos pueden ser pretratados por varios métodos para eliminar las bacterias consumidoras de hidrógeno y preservar la actividad de las productoras.

Montes *et al.*, (2007) realizaron pruebas de actividad anaerobia para la selección del inóculo que presentara los mejores resultados en la producción de hidrógeno por fermentación. Los autores estudiaron cuatro fuentes de inóculo 1. Lodos activados, 2. Lodo granular anaerobio, 3. Estiércol de vaca y 4. Composta de hojarasca, usando glucosa como única fuente de carbono a 26 °C y un pH de 6.2. Lo que encontraron fue una mayor producción de hidrógeno usando el inóculo derivado del lodo granular, con un valor de 1.79 ± 0.20 mmol de hidrógeno respecto de los demás inóculos evaluados.

Carvajal (2009) reportó que el máximo rendimiento molar de hidrógeno obtenido fue de 2.25 ± 0.18 mol de H₂/ mol de glucosa alimentada, utilizando el inóculo MESO1 (colectado de un reactor UASB que trata las aguas de una industria cervecera ubicada en Toluca) alcanzando rendimientos comparables con estudios realizados en cultivos puros por Taguchi *et al.* (1995) quienes reportaron que el mayor rendimiento molar de hidrógeno por mol de glucosa alimentada con bacterias *Clostridium* sp fue de 1.61 – 2.36 mol de H₂ por mol de glucosa alimentada y ligeramente menor a los resultados reportados por Ueno *et al.* (2001) que obtuvieron un rendimiento molar de hidrógeno de 2.52 mol de H₂ por mol de glucosa a partir del agua residual de una industria de azúcar, operando un reactor continuo a nivel de laboratorio, con microflora mixta

Tabla 1.3. Cultivos puros de bacterias productoras de hidrógeno por fermentación

| Inóculo | Sustrato | Tipo de Reactor | Producción máxima de H ₂ | Referencia |
|--|---------------------|-----------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| <i>Clostridium acetobutylicum</i> | Glucosa | Discontinuo | 2 mol/mol glucosa | Chin <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 | Glucosa | Continuo | 1.08 mol/mol glucosa | Zhang <i>et al.</i> 2006 |
| <i>Clostridium butyricum</i> CGS5 | Xilosa | Discontinuo | 0.73 mol/mol xilosa | Lo <i>et al.</i> . 2008 |
| <i>Clostridium butyricum</i> CGS2 | Almidón | Discontinuo | 9.95 mmol/ g DQO | Chen <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Clostridium pasteurianum</i> CH ₄ | Sucrosa | Discontinuo | 2.07 mol/ mol hexosa | Lo <i>et al.</i> . 2008 |
| <i>Clostridium paraputrificum</i> M-21 | Desechos residuales | Discontinuo | 2.2 mol/ mol sustrato | Evvyernie <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Clostridium thermocellum</i> 27405 | Biomasa celulósica | Discontinuo | 2.3 mol/ mol de glucosa | Levin <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Clostridium thermolacticum</i> | Lactosa | Continuo | 3 mol/ mol lactosa | Collect <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Clostridium</i> sp. variedad no.2 | Celulosa | Continuo | 0.3 mol/mol glucosa | Taguchi <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>Clostridium</i> sp. famp2 | Glucosa | Discontinuo | 0.2 mol/ L medio | Pan <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> HO-39 | Glucosa | Discontinuo | 1 mol/ mol glucosa | Yokoi <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08 | Glucosa | Continuo | - | Kumar <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08 | Sucrosa | Discontinuo | 6 mol/ mol sucrosa | Kumar <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08 | Celobiosa | Discontinuo | 5.4 mol/ mol celobiosa | Kumar <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Escherichia Coli</i> MC13-4 | Glucosa | Discontinuo | 1.2mol/ mol glucosa | Ishikawa <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Escherichia coli</i> | Glucosa | Discontinuo | 2 mol/ mol glucosa | Baisaillon <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Escherichia coli</i> | Glucosa | Continuo | 2 mol/ mol glucosa | Turcot <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. GZ1 | Lodos residuales | Discontinuo | 0.007 mol/ g DQO | Guo <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> KU001 | Glucosa | Discontinuo | 2.4 mol/ mol glucosa | Ueno <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1 | Almidón | Continuo | - | Kanai <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Thermotoga elfii</i> | Glucosa | Discontinuo | 84.9 mmol/ L medio | Van Neil <i>et al.</i> , 2002 |
| Hydrogen- Producing bacteria B49 | Glucosa | Discontinuo | 0.1 mL/ L cultivo | Wang <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Ruminococcus albus</i> | Glucosa | Discontinuo | 2.52 mol/ mol glucosa | Ntaikou <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Hafnia alvei</i> | Glucosa | Discontinuo | - | Podesta <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>Citrobacter amalonaticus</i> Y19 | Glucosa | Discontinuo | 8.7 mol/ mol glucosa | Oh <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Ethanoligenens harbinense</i> YUAN-3 | Glucosa | Continuo | 1.93 mol/ mol glucosa | Xing <i>et al.</i> , 2008 |

1.3.1.1 Pretratamiento del Inóculo

Los métodos de pretratamiento reportados para enriquecer las bacterias productoras de hidrógeno de los cultivos mixtos principalmente son: choque térmico, acidificación, alcalinización, congelación y fusión, adición de cloroformo, 2-bromoetanosulfonato de sodio o ácido 2-bromoetanosulfónico e iodopropano (Cheong *et al.*, 2006).

Cada uno de los métodos de pretratamiento tiene propiedades diferentes y se han realizado comparaciones entre estos métodos a fin de encontrar el adecuado para un proceso dado de producción de hidrógeno por fermentación. La tabla 1.4 resume varios estudios comparando diferentes métodos de pretratamiento para enriquecer las bacterias productoras de hidrógeno.

Tabla 1.4 Comparación entre varios métodos de pretratamiento para enriquecer a las bacterias productoras de hidrógeno de un inóculo mixto.

| Inóculo | Método de pretratamiento de inóculo estudiado | Sustratos | Tipo de Reactor | Máxima producción de H ₂ | Método de pretratamiento óptimo | Referencia |
|-------------------------------------|--|---------------|-----------------|-------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Lodos de digestión | Acidificación, alcalinización, térmico, aeración y cloroformo | Glucosa | Discontinuo | 1.8 mol/ mol glucosa | Térmico | Wang 2008 |
| Estiércol de ganado | Congelación y fusión, acidificación, térmico, 2-bromoetanosulfonato de sodio | Glucosa | Discontinuo | 1 mol/ mol glucosa | Acidificación | Cheong <i>et al.</i> , 2006 |
| Granulos metanogénicos | Acidificación, térmico, cloroformo | Glucosa | Discontinuo | 1.2 mol/ mol glucosa | Cloroformo | Hu <i>et al.</i> , 2007 |
| Lodos de digestión de agua residual | Térmico, aeración, acidificación, alcalinización, ácido 2-bromoetanosulfónico, yodopropano | Sucrosa | Discontinuo | 6.12 mol/ mol sucrosa | Alcalinización | Zhu <i>et al.</i> , 2006 |
| Lodos anaerobios | 2-bromoetanosulfonato de sodio, térmico | Agua residual | Discontinuo | 0.0317 mmol/ g DQO | 2-bromoetanosulfonato de sodio | Mohan <i>et al.</i> , 2008 |

Como se puede ver en la tabla anterior existen ciertos desacuerdos en cuanto al tratamiento óptimo. La posible razón pueden ser las cantidades de inóculo usados para estos estudios y la clase de sustrato, entre otros (Mohan *et al.*, 2008).

Algunas especies de microorganismos como *Bacillus* y *Clostridium* tienen la capacidad de esporular cuando las condiciones ambientales se tornan hostiles como cuando ocurre un choque térmico, cambios en los nutrientes, la presencia de químicos nocivos, entre otros. Las esporas son metabólicamente inactivas y resistentes al calor, radiación, desecación, pH extremo y químicos tóxicos. En ambientes anaerobios, los principales microorganismos formadores de esporas son varios géneros de bacterias acidogénicas. Este hecho ha sido usado por varios autores para eliminar microorganismos no formadores de esporas, principalmente metanogénicos, por medio de tratamiento térmico típicamente a ~100 °C durante 15-120 min. Este tratamiento es el más usado en la producción de H₂ ya que selecciona esporas de bacterias acidogénicas que germinarán y producirán hidrógeno una vez que las condiciones vuelvan a ser favorables para el crecimiento.

La transición de esporas inactivas a esporas activas puede ser dividida en tres fases (Figura 1.7): activación, germinación y crecimiento. La activación de las esporas se logra a través de calentamiento en una suspensión acuosa. Después, la germinación es iniciada por la interacción de las esporas con germinantes específicos (Valdez & Poggi, 2009).

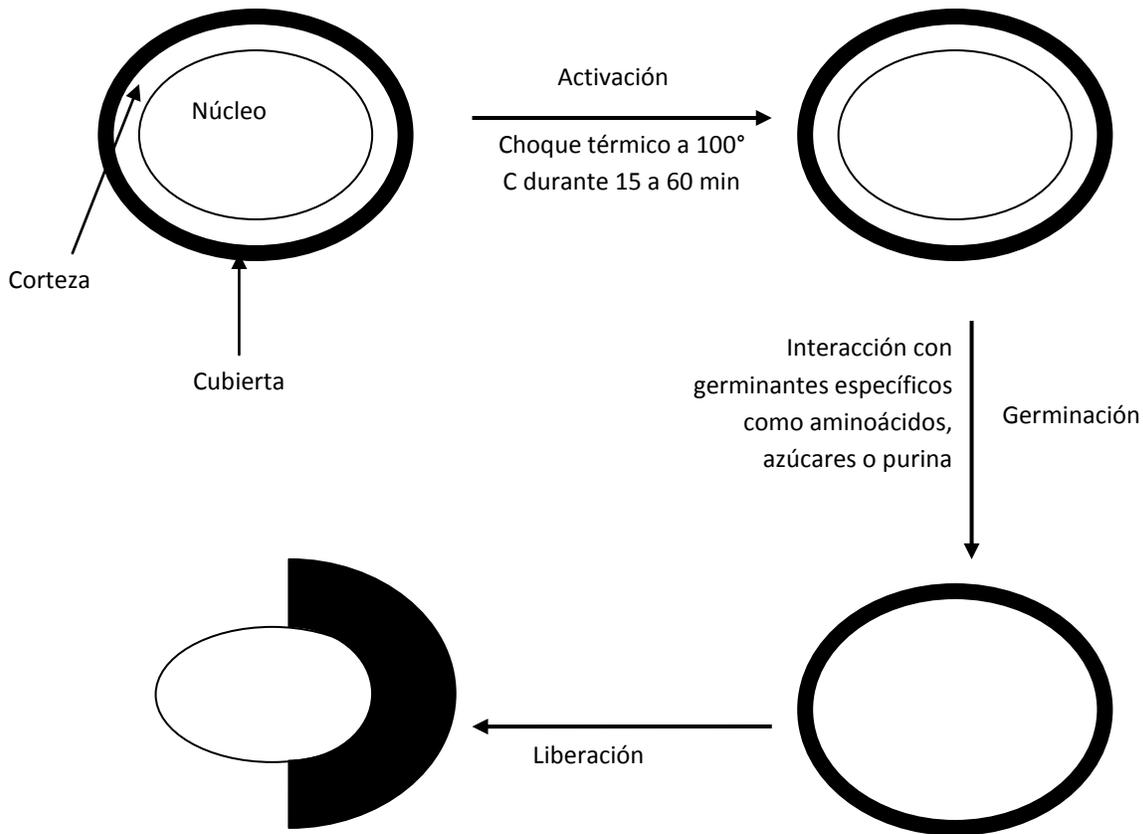


Figura 1.7. Transición de una espora inactiva a una forma activa (Valdez & Poggi, 2009).

1.3.2 Sustrato

Una gran cantidad de sustratos han sido usados para la producción de hidrógeno por fermentación. La tabla 1.5 muestra estudios realizados usando varios sustratos para la producción de hidrógeno por fermentación. Como se puede observar, la glucosa, la sucrosa y el almidón fueron los sustratos más usados. Sin embargo en años recientes se han empezado a usar desechos orgánicos como sustrato. Ha sido demostrado que en un rango apropiado, el incremento de la concentración del sustrato puede incrementar la habilidad de las bacterias productoras de hidrógeno durante la producción de hidrógeno, pero una concentración demasiado alta puede afectar dicha habilidad. Existen ciertos desacuerdos en cuanto a la concentración óptima de sustrato para la producción de hidrógeno por fermentación, por ejemplo Van Ginkel *et al.*, (2001) reportó 7.5 g DQO/L mientras que Lo *et al.*, (2008) reportó 40g DQO/L. La posible razón de esta diferencia son los rangos de estudio tanto de inóculo como de sustrato.

Tabla 1.5. Comparación entre varios sustratos para la producción de hidrógeno por fermentación

| Inóculo | Sustrato | Tipo de Reactor | Concentración de sustrato (g DQO/L) | | Máxima producción de H ₂ | Referencia |
|--|----------------------------|-----------------|-------------------------------------|--------|-------------------------------------|---------------------------------|
| | | | Rango estudiado | Óptimo | | |
| <i>Clostridium butyricum</i> CGS5 | Xilosa | Discontinuo | 5 - 40 | 20 | 172.9 mL | Lo <i>et al.</i> , 2008 |
| Lodos de desechos municipales | Xilosa | Continuo | 10 - 100 | 20 | 2.25 mol/ mol xilosa | Lin <i>et al.</i> , 2006 |
| Lodos anaerobios | Glucosa | Discontinuo | 0.27 – 4.3 | 1.1 | 0.13 mL/h | Zheng <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 | Glucosa | Continuo | 1.1 – 11.2 | 11.2 | 1270 mL/g glucosa-L reactor | Zhang <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Ethanoligenes harbinense</i> YUAN-3 | Glucosa | Discontinuo | 5.3 – 21.3 | 10.7 | 1.93 mol/ mol glucosa | Xing <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Thermoanaerobacterium Thermosaccharolyticum</i> PSU-2 | Sucrosa | Discontinuo | 5.6 - 56 | 5.6 | 6 mol/ mol sucrosa | O-Thong <i>et al.</i> , 2008 |
| Cultivo mixto | Sucrosa | Discontinuo | 1.5 – 7.5 | 7.5 | 38.9 mL/ g DQO-L cultivo | Van Ginkel <i>et al.</i> , 2001 |
| Lodos de desechos municipales | Sucrosa | Discontinuo | 10 - 30 | 10 | 2.46 mol/ mol sucrosa | Wang <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Clostridium butyricum</i> CGS5 | Glucosa | Discontinuo | 5 - 30 | 20 | 2.78 mol/ mol sucrosa | Chen <i>et al.</i> , 2005 |
| Lodos de digestor anaerobio | Sucrosa | Continuo | 10 - 60 | 30 | 1.22 mol/ mol hexosa | Kim <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Clostridium pasteurianum</i> CH ₄ | Sucrosa | Discontinuo | 5 - 40 | 40 | 2.07 mol/ mol hexosa | Lo <i>et al.</i> , 2008 |
| Lodos anaerobios | Almidón | Discontinuo | 9.8 - 39 | 9.8 | 67 mL/ g almidón | Zhang <i>et al.</i> , 2003 |
| Lodos anaerobios | Almidón | Discontinuo | 5 - 60 | 20 | 2.2 mol/ mol hexosa | Lin <i>et al.</i> , 2008 |
| Lodos de desechos municipales | Almidón | Discontinuo | 8 - 32 | 32 | 11.25 mmol/ g almidón | Lee <i>et al.</i> , 2008 |
| Composta de estiércol de vaca | Tallos de maíz | Discontinuo | 5.3 – 42.7 | 16 | 149.69 mL/ SVT | Zhang <i>et al.</i> , 2007 |
| Lodos de digestor anaerobio | Slurry de arroz | Discontinuo | 2.9 – 23.6 | 5.9 | 346 mL/ g carbohidrato | Fang <i>et al.</i> , 2006 |
| Composta de estiércol de vaca | Sedimentos de cerveza | Discontinuo | 5.3 – 53.3 | 21.3 | 68.6 mL/ SVT | Fan <i>et al.</i> , 2006 |
| Lodos de digestor anaerobio | Desechos de comida | Discontinuo | 0 – 32.3 | 4.6 | 101 mL/ g DQO | Chen <i>et al.</i> , 2006 |
| Lodos anaerobios | Desechos de comida | Discontinuo | 3.2 – 10.7 | 6.4 | 1.8 mol/ mol de hexosa | Shin <i>et al.</i> , 2004 |
| Lodos de digestor anaerobio | Leche seca sin grasa | Discontinuo | 0 - 96 | 4 | 119 mL/ g DQO | Chen <i>et al.</i> , 2006 |
| Lodos activados | Desechos de comida | Discontinuo | 10 -160 | 40 | 47.1 mmol/ g DQO | Wu <i>et al.</i> , 2004 |
| Lodos de desechos municipales | Residuos de vinos de arroz | Continuo | 14 - 36 | 14 | 1.9 mol/ mol hexosa | Yu <i>et al.</i> , 2002 |

Algunos sustratos complejos, como los residuos agrícolas y vinazas que contienen celulosa, hemicelulosa, lignina, proteínas entre otros compuestos, no son ideales para la producción de hidrógeno por fermentación debido a sus estructuras complejas, sin embargo después de ser pretratados por algunos métodos, pueden ser fácilmente usados por las bacterias productoras de hidrógeno.

Los lodos activados de las plantas de tratamiento de aguas residuales, contienen altos niveles de materia orgánica y por lo tanto son un sustrato potencial para la producción de hidrógeno. Después de un pretratamiento apropiado como, ultrasonicación, acidificación, congelación y fusión, esterilización, inhibición de bacterias metanogénicas, o microondas, la habilidad de las bacterias productoras de hidrógeno por fermentación puede ser mejorada. (Zhang *et al.*, 2007).

La tabla 1.6 presenta estudios comparando varios métodos de pretratamiento del sustrato para la producción de hidrógeno por fermentación.

Tabla 1.6. Diferentes métodos de pretratamiento del sustrato para lodos activados

| Inóculo | Tipo de Reactor | Método de pretratamiento del sustrato | Método óptimo | Máxima producción de H ₂ | Referencia |
|---------------------------------|-----------------|--|----------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| <i>Clostridium bifermentans</i> | Discontinuo | Congelación y fusión, ultrasonicación, acidificación, esterilización, inhibidor metanogénico | Congelación y fusión | 2.1 mmol/ g DQO | Wang <i>et al.</i> 2003 |
| <i>Clostridium bifermentans</i> | Discontinuo | Congelación y fusión, ultrasonicación, acidificación, esterilización | Congelación y fusión | 4.1 g/ Kg SD | Ting <i>et al.</i> 2004 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. GZ1 | Discontinuo | Esterilización, microondas, ultrasonicación | Esterilización | 15.02 mL/ g DQO | Gou <i>et al.</i> 2008 |

Es importante hacer notar que cuando se usa como inóculo a *Clostridium bifermentans* el pretratamiento óptimo es el de congelación y fusión mientras que para *Pseudomonas* es el de esterilización. Esto quiere decir que el método a emplear depende del inóculo usado (Guo *et al.* 2008).

1.3.3 Tipo de Reactor y Tiempo de retención hidráulica

Las tablas anteriores muestran que la mayoría de los estudios de la producción de hidrógeno por fermentación se han realizado en reactores discontinuos debido a su simple operación y control. Sin embargo, operaciones a gran escala podrían requerir procesos de producción continua. La tabla 1.7 resume varios estudios usando reactores continuos para la producción de hidrógeno por fermentación. Como muestra la siguiente tabla, el reactor CSTR (continuous stirred tank reactor) fue ampliamente usado para la producción de hidrógeno por fermentación (Chen *et al.* 2008).

Tabla 1.7. Reactores continuos usados para la producción de hidrógeno por fermentación

| Inóculo | Sustrato | Tipo de Reactor | Tiempo de retención hidráulica (h) | | Máxima producción de H ₂ | Referencia |
|------------------------------|----------|---|------------------------------------|--------|-------------------------------------|---------------------------|
| | | | Rango estudiado | Óptima | | |
| Lodos municipales | Glucosa | CSTR | 0.5 – 2 | 0.5 | 1.81 mol/ mol glucosa | Zhang <i>et al.</i> 2007 |
| Lodos anaerobios | Glucosa | CSTR | 2 – 12 | 4 | 115.68 mmol/ d | Gavala <i>et al.</i> 2006 |
| Lodos municipales | Sucrosa | CSTR | 2 -12 | 4 | 4.7 mol/ mol sucrosa | Chen <i>et al.</i> 2008 |
| Lodos municipales | Fructosa | CSTR | 2 – 8 | 8 | 1.68 mol/ mol hexosa | Lee <i>et al.</i> 2007 |
| Lodos anaerobios | Almidón | CSTR | 2 -12 | 12 | 1.5 mol/ mol hexosa | Lin <i>et al.</i> 2008 |
| Lodos de digestión anaerobia | Glucosa | CSTR | 6 -12 | 10 | 1.95 mol/ mol glucosa | Zhang <i>et al.</i> 2006 |
| Lodos anaerobios | Glucosa | CSTR | 4 – 12 | 10 | 1.63 mol/ mol glucosa | Wu <i>et al.</i> 2008 |
| Lodos municipales | Xilosa | CSTR | 4 – 12 | 12 | 1.63 mol/ mol xilosa | Wu <i>et al.</i> 2008 |
| Lodos municipales | Glucosa | CSTR | 4 -12 | 12 | 1.36 mol/ mol hexosa | Lee <i>et al.</i> 2007 |
| Lodos municipales | Sucrosa | CSTR | 2 -12 | 12 | 1.6 mol/ mol hexosa | Lee <i>et al.</i> 2007 |
| Lodos de digestor anaerobio | Almidón | CSTR | 4 -18 | 12 | 0.92 mol/ mol glucosa | Arooj <i>et al.</i> 2008 |
| Lodos municipales | Sucrosa | UASB | 4 -24 | 8 | 1.5 mmol/ mol sucrosa | Chang <i>et al.</i> 2004 |
| Lodos anaerobios | Glucosa | UASB | 2 – 12 | 12 | 96 mmol/ d | Gavala <i>et al.</i> 2006 |
| Lodos residuales | Sucrosa | UASB | 6 -24 | 8 | 3.6 mol / mol sucrosa | Chang <i>et al.</i> 2006 |
| Lodos de digestor anaerobio | Glucosa | Reactor de lecho fluidizado con biopelícula anaerobia | 0.125 - 3 | 0.25 | 1.7 mol/ mol glucosa | Zhang <i>et al.</i> 2008 |
| Lodos de digestor anaerobio | Glucosa | Reactor de lecho fluidizado de gránulos anaerobios | 0.125 - 3 | 0.25 | 1.6 mol/mol glucosa | Zhang <i>et al.</i> 2008 |
| Lodos municipales | Sucrosa | Reactor de lecho de lodo granular inducido | 0.25 - 4 | 0.5 | 3.3 mol/ mol sucrosa | Lee <i>et al.</i> 2004 |
| Lodos municipales | Sucrosa | Reactor empacado | 0.5 – 4 | 4 | 3.9 mol/ mol sucrosa | Lee <i>et al.</i> 2004 |
| Lodos municipales | Glucosa | Biorreactor de membrana | 1 – 4 | 4 | 1.72 mol/ mol hexosa | Lee <i>et al.</i> 2007 |
| Lodos municipales | Xilosa | CSTR con biomasa fija | 2 – 6 | 6 | 0.8 mol/ mol xilosa | Wu <i>et al.</i> 2008 |

En un CSTR convencional, la biomasa está suspendida en el licor mezclado, el cual tiene la misma composición que el efluente. Como la biomasa tiene el mismo tiempo de retención que el tiempo de retención hidráulica, el lavado de la biomasa puede ocurrir a tiempos de retención hidráulica cortos, por lo tanto la concentración de la biomasa en la mezcla y la producción de hidrógeno están limitadas.

Los reactores con biomasa inmovilizada proveen una alternativa al convencional CSTR, porque son capaces de mantener altas concentraciones de biomasa y pueden operar con tiempos de retención cortos sin que ocurra el lavado de biomasa. Por ejemplo, Zhang *et al.*(2008) encontraron que la formación de lodo granular facilitó la concentración de la biomasa.

Se ha demostrado que al incrementar el tiempo de retención hidráulica, puede aumentar la habilidad de las bacterias productoras de hidrógeno, sin embargo un tiempo demasiado alto, puede afectar esta habilidad (Chen *et al.* 2008).

En estos estudios también hay desacuerdos en cuanto al tiempo de retención hidráulica óptimo, por ejemplo Zhang *et al* (2007) reportó 0.5h mientras que el óptimo para Arooj *et al.*, fue de 12h. La posible razón de estas diferencias puede deberse a la a la diferencia entre el inóculo estudiado, el sustrato empleado y el rango de tiempo de retención hidráulica.

1.3.4 Nitrógeno y Fosfato

Debido a que el nitrógeno es un componente muy importante de las proteínas, ácidos nucleicos y enzimas es de gran importancia en el crecimiento de las bacterias productoras de hidrógeno. Por lo tanto un nivel apropiado de nitrógeno es benéfico para las bacterias productoras de hidrógeno (Baisaillon *et al.*, 2006).

La tabla 1.8 presenta estudios realizados con el fin de investigar el efecto de la concentración del nitrógeno en la producción de hidrógeno por fermentación.

Tabla 1.8. Efecto de la concentración de nitrógeno en la producción de hidrógeno por fermentación

| Inóculo | sustrato | Tipo de reactor | Fuente de N | Concentración de N | | Máxima producción de H ₂ | Referencia |
|-------------------------------------|--------------------|-----------------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| | | | | Rango estudiado | óptimo | | |
| <i>Escherichia coli</i> | Glucosa | Discontinuo | NH ₄ Cl | 0 – 0.2 g N/L | 0.01 g N/L | 1.7 mol/ mol glucosa | Baisaillon <i>et al.</i> , 2006 |
| Lodo sin agua | Glucosa | Discontinuo | NH ₄ Cl | 0.5 – 10 g N/L | 7 g N/L | 150 mL | Salerno <i>et al.</i> , 2006 |
| Composta de pasto | Desechos de comida | Discontinuo | NH ₄ HCO ₃ | 0 - 0.6 g N/L | 0.4 g N/L | 77 mL/ g SVT | Lay <i>et al.</i> , 2005 |
| Cereal molido | Almidón | Discontinuo | NH ₄ HCO ₃ | 0.1 – 2 g N/L | 0.1 – 2 g N/L | 1 g N/L | Liu <i>et al.</i> , 2004 |
| Composta | Glucosa | Discontinuo | Extracto de levadura | 2 – 8% extracto de levadura | 4% extracto de levadura | 70 mmol | Morimoto <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> HO-39 | Glucosa | Discontinuo | Polipeptona | 0 – 5% polipeptona | 2% polipeptona | 58 mL | Yokoi <i>et al.</i> , 1995 |

Se observa que el nitrógeno en forma de amonio es la fuente de nitrógeno mas investigada para la producción de hidrógeno por fermentación.

El fosfato es necesario para la producción de hidrógeno debido a su valor nutricional además de su capacidad como buffer. Se ha demostrado que dentro de un rango apropiado, incrementar la concentración de fosfato puede incrementar la habilidad de las bacterias productoras de hidrógeno, pero niveles demasiados altos de fosfato pueden resultar contraproducente (Lay *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que una relación apropiada de carbón/nitrógeno (C/N) y carbón/fósforo (C/P) son fundamentales para la producción de hidrógeno por fermentación. En la tabla 1.9 se muestran estudios realizados para investigar los efectos de estas relaciones.

Tabla 1.9. Efecto de la relación C/N y C/P en la producción de hidrógeno por fermentación

| Inóculo | Sustrato | Tipo de Reactor | C/N | | C/P | | Máxima producción de H ₂ | Referencia |
|------------------|---|-----------------|-----------------|--------|-----------------|--------|-------------------------------------|------------------------------|
| | | | Rango estudiado | óptimo | Rango estudiado | óptimo | | |
| Lodos activados | sucrosa | Discontinuo | 40 - 130 | 47 | - | - | 4.8 mol/ mol sucrosa | Lin <i>et al.</i> , 2004 |
| Lodos anaerobios | Trigo polvo | Discontinuo | 20 - 200 | 200 | 50 - 1000 | 1000 | 281 mL/ g almidón | Argun <i>et al.</i> , 2008 |
| Lodos anaerobios | Efluente de molino para extraer aceite de palma | Discontinuo | 45 -95 | 74 | 450 - 650 | 559 | 6.33 L/ L sustrato | O-Thong <i>et al.</i> , 2008 |

1.3.5 Iones Metálicos

Aunque en altas concentraciones, los iones metálicos pueden inhibir la actividad de las bacterias productoras de hidrógeno, un nivel traza de dichos iones es necesario para la producción de hidrógeno. La tabla 1.10 presenta estudios realizados para evaluar el efecto de la concentración de algunos iones metálicos en la producción de hidrógeno por fermentación.

Como se muestra en la tabla, el Fe²⁺ fue el más investigado para la producción de hidrógeno por fermentación, esto se debe principalmente a que su presencia es esencial para la hidrogenasa (Wang *et al.*, 2008).

Otras investigaciones se han desarrollado para investigar la toxicidad de los metales pesados dentro de la producción de hidrógeno por fermentación. Por ejemplo Li y Fang reportaron que la toxicidad relativa de seis metales para la producción de hidrógeno por fermentación fue en el orden siguiente Cu>Ni-Zn>Cr>Cd>Pb (Li *et al.*, 2007).

Tabla1.10. Efecto de la concentración de iones metálicos en la producción de hidrógeno por fermentación

| Inóculo | Sustrato | Tipo de Reactor | Ion | Concentración (mg/L) | | Máxima producción de H ₂ | Referencia |
|--|---|-----------------|------------------|----------------------|--------|-------------------------------------|------------------------------|
| | | | | Rango estudiado | óptimo | | |
| Lodos anaerobios | Almidón | Discontinuo | Fe ²⁺ | 0 - 1473.7 | 55.3 | 296.2 mL/ g almidón | Yang <i>et al.</i> , 2006 |
| Composta de pasto | Desechos de comida | Discontinuo | Fe ²⁺ | 0 - 250 | 132 | 77 mL/ g SVT | Lay <i>et al.</i> , 2005 |
| Lodos anaerobios | Efluente de molino para extraer aceite de palma | Bact | Fe ²⁺ | 2 - 400 | 257 | 6.33 L/ L sustrato | O-Thong <i>et al.</i> , 2008 |
| Lodos de digestion | Glucosa | Discontinuo | Fe ²⁺ | 0 - 1500 | 350 | 311.2 mL/ g glucosa | Wang <i>et al.</i> , 2008 |
| Bacterias productoras de hidrógeno B49 | Glucosa | Discontinuo | Mg ²⁺ | 1.2 - 23.6 | 23.6 | 2360.5 mL/ L cultivo | Wang <i>et al.</i> , 2007 |
| Lodos de digestion | Glucosa | Discontinuo | Ni ²⁺ | 0 - 50 | 0.1 | 296.1 mL/ g glucosa | Wang <i>et al.</i> , 2008 |
| Lodos de digestion | Sucrosa | Continuo | Ca ²⁺ | 0 - 300 | 150 | 3.6 mol/ mol sucrosa | Chang <i>et al.</i> , 2006 |
| Lodos municipales | Sucrosa | Continuo | Ca ²⁺ | 0 - 27.2 | 27.2 | 2.19 mol/ mol sucrosa | Lee <i>et al.</i> , 2004 |

1.3.6 Temperatura

La temperatura es uno de los factores más importantes que influencia la actividad de las bacterias productoras de hidrógeno y por lo tanto la producción de hidrógeno por fermentación. Se ha demostrado como con otros factores, que dentro de un rango apropiado, un incremento en la temperatura puede mejorar la habilidad de las bacterias productoras de hidrógeno, temperaturas muy altas puede inhibir esa actividad (Wang *et al.*, 2008). La tabla 1.11 resume varios estudios donde se investigó el efecto de la temperatura en la producción de hidrógeno por fermentación.

Wang J. y Wan W, (2009) reportaron que la concentración de etanol en pruebas discontinuo se incrementa cuando la temperatura se incrementa de 20°C a 35°C, pero disminuye si la temperatura se eleva nuevamente de 35°C a 55°C. Sus resultados también reportaron que la concentración de ácido acético en pruebas discontinuo se incrementa cuando la temperatura se eleva de 20°C a 35°C, pero tiende a decrecer cuando la temperatura se eleva de 35° a 55°C. El cambio en la concentración de etanol y ácido acético a metabolitos solubles cuando se incrementa la temperatura puede resultar de la ruta metabólica seguida por las bacterias dominantes a causa de la temperatura.

Tabla 1.11. Efecto de la temperatura en la producción de hidrógeno por fermentación

| Inóculo | Sustrato | Tipo de Reactor | Temperatura (°C) | | Máxima producción de H ₂ | Referencia |
|--|-----------------------------|-----------------|------------------|--------|-------------------------------------|-------------------------------|
| | | | Rango estudiado | óptimo | | |
| <i>Ethanoligenens harbinense</i> YUAN-3 | Glucosa | Discontinuo | 20 – 44 | 37 | 1.34 mol/ mol glucosa | Xing <i>et al.</i> , 2008 |
| Lodos anaerobios | Glucosa | Discontinuo | 25 – 55 | 40 | 275.1 mL/ g glucosa | Wang <i>et al.</i> , 2008 |
| Lodos anaerobios | Glucosa | Discontinuo | 33 – 41 | 41 | 1.67 mol/ mol glucosa | Mu <i>et al.</i> , 2006 |
| Lodos anaerobios | Sucrosa | Discontinuo | 25 – 45 | 35.1 | 3.7 mol/ mol sucrosa | Wang <i>et al.</i> , 2005 |
| Lodos anaerobios | Sucrosa | Discontinuo | 25 – 45 | 35.5 | 252 ml/ g sucrosa | Mu <i>et al.</i> , 2006 |
| Lodos de disgestor anaerobio | Slurry de arroz | Discontinuo | 37 – 55 | 37 | 346 mL/ g carobohidrato | Fang <i>et al.</i> , 2006 |
| Lodos municipales | Sucrosa | Continuo | 30 – 45 | 40 | 3.88 mol/ mol sucrosa | Lee <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> PSU-2 | Sucrosa | Discontinuo | 40 – 80 | 60 | 2.53 mol/ mol hexosa | O-Thong <i>et al.</i> , 2008 |
| Lodos municipales | Almidón | Discontinuo | 37 – 55 | 55 | 1.44 mmol/ g almidón | Lee <i>et al.</i> , 2008 |
| Estiércol de vaca | Estiércol de vaca | Discontinuo | 37 – 75 | 60 | 743 mL/ kg de estiércol de vaca | Yokoyama <i>et al.</i> , 2007 |
| Slurry de estiércol de vaca | Slurry de estiércol de vaca | Discontinuo | 37 – 85 | 60 | 392 mL/ L slurry | Yokoyama <i>et al.</i> , 2007 |
| Lodos de digestor anaerobio | Desechos orgánicos | Semicontinuo | 37 – 55 | 55 | 360mL/ g SV | Valdez <i>et al.</i> , 2005 |

En estudios realizados por Carvajal (2009) se observó que independientemente de la temperatura del origen del inóculo, para todos los casos evaluados la velocidad específica de producción de hidrógeno se presentó por encima de los 35°C.

1.3.7 pH

Este es otro factor importante que afecta las actividades de las bacterias productoras de hidrógeno y la producción de hidrógeno por fermentación debido a que puede afectar la actividad de la hidrogenasa y por lo tanto la ruta metabólica seguida. Se ha demostrado que dentro de un rango apropiado, al incrementar el pH se puede incrementar la habilidad de las bacterias que producen hidrógeno durante el proceso de producción de hidrógeno por fermentación, pero pH's altos pueden disminuir dicha habilidad.

La tabla 1.12 resume varios estudios que se hicieron para investigar el efecto de pH inicial en la producción de hidrógeno por fermentación en reactor discontinuo.

Tabla 1.12. Efecto del pH inicial en la producción de hidrógeno por fermentación en un reactor discontinuo

| Inóculo | Sustrato | pH inicial | | Máxima producción de H ₂ | Referencia |
|--|--------------------|-----------------|--------|-------------------------------------|------------------------------|
| | | Rango estudiado | óptimo | | |
| Composta | Sucrosa | 4.5 – 6.5 | 4.5 | 214 mL/ g DQO | Khanal <i>et al.</i> , 2004 |
| Lodos anaerobios | Almidón | 5 - 7 | 5 | 1.1 mol/ mol hexosa | Lin <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Clostridium butyricum</i> CGS5 | Sucrosa | 5 – 6.5 | 5.5 | 2.78 mol/ mol sucrosa | Chen <i>et al.</i> , 2005 |
| Lodos activados | Desechos de comida | 4 - 8 | 6 | 47.1 mmol/ g DQO | Wu <i>et al.</i> , 2004 |
| Lodos anaerobios | Almidón | 4 - 9 | 6 | 92 mL/ g almidón | Zhang <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> PSU-2 | Sucrosa | 4 – 8.5 | 6.2 | 2.53 mol/ mol hexosa | O-Thong <i>et al.</i> , 2008 |
| Lodos municipales | Xilosa | 5 – 9.5 | 6.5 | 2.25 mol/ mol xilosa | Lin <i>et al.</i> , 2006 |
| Lodos municipales | Xilosa | 5 - 8 | 6.5 | 1.3 mol/ mol xilosa | Lin <i>et al.</i> , 2006 |
| Composta de estiércol de vaca | Tallos de maíz | 4 - 9 | 7 | 149.69 mL/ SVT | Zhang <i>et al.</i> , 2007 |
| Lodos de estiércol de vaca | Celulosa | 5.5 - 9 | 7.5 | 2.8 mmol/ g celulosa | Lin <i>et al.</i> , 2008 |
| Lodos municipales | Sucrosa | 5.5 – 8.5 | 7.5 | 2.46 mol/ mol sucrosa | Wang <i>et al.</i> , 2006 |
| Lodos granular anaerobio | Glucosa | 3.88 – 8.12 | 7.5 | 1.46 mol/ mol glucosa | Davila <i>et al.</i> , 2008 |
| Lodos de digestor anaerobio | Sucrosa | 3 - 12 | 9 | 126.9 mL/ g sucrosa | Lee <i>et al.</i> , 2002 |

Además de los estudios reportados para el pH inicial, en años recientes se han desarrollado, estudios también del efecto del pH durante el transcurso del proceso, la tabla 1.13 resume estos estudios.

Tabla 1.13. Efecto del pH en la producción de hidrógeno por fermentación

| Inóculo | Sustrato | Tipo de reactor | pH inicial | | Máxima producción de H ₂ | Referencia |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------|-------------------------------------|----------------------------|
| | | | Rango estudiado | óptimo | | |
| Lodos de digestor anaerobio | Slurry de arroz | Discontinuo | 4 - 7 | 4.5 | 346 mL/ g almidón | Fang <i>et al.</i> , 2006 |
| Lodos anaerobios | Sucrosa | Discontinuo | 4.7 – 6.3 | 5.5 | 3.7 mol/ mol sucrosa | Wang <i>et al.</i> , 2005 |
| Lodos anaerobios | Sucrosa | Discontinuo | 4.5 – 6.5 | 5.5 | 252 mL/ g sucrosa | Mu <i>et al.</i> 2006 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08 | Sucrosa | Discontinuo | 4.5 – 7.5 | 6 | 29.63 mmol/ g células secas | Kumar <i>et al.</i> , 2000 |
| Cultivo mixto | Sucrosa | Continuo | 3.4 – 6.3 | 4.2 | 1.61 mol/ mol glucosa | Mu <i>et al.</i> , 2006 |
| Lodos anaerobios | Glucosa | Continuo | 4 - 7 | 5.5 | 2.1 mol/ mol glucosa | Fang <i>et al.</i> , 2002 |
| Cultivo mixto | Sucrosa | Continuo | 6.1 – 9.5 | 7 | 1.61 mol/ mol glucosa | Zhao <i>et al.</i> , 2008 |

Observando las tablas 1.12 y 1.13 se nota que es ideal empezar en un pH alrededor de 7 para que a medida que la reacción avanza el pH no caiga mas allá de 5.5 que es el ideal reportado para la producción de H₂.

1.3.8 Presión parcial de H₂

El incremento en la presión parcial del H₂ en el espacio de cabeza del reactor durante la fermentación ha sido asociado con el decremento en la producción de H₂. Se ha observado que cuando la presión parcial de H₂ se incrementa a cierto nivel, en el espacio de cabeza del reactor, se produce un cambio de la producción de ácidos grasos a la producción de alcoholes resultando en una menor producción de H₂. Bajo estas condiciones, el potencial redox H⁺/H₂ disminuye y el flujo de electrones de la ferredoxina reducida hacia hidrógeno molecular a través de la hidrogenasa es inhibido.

Se han desarrollado diversas estrategias para evitar la acumulación de H₂ en espacio de cabeza del reactor. Por ejemplo, se ha reportado el burbujeo de un gas inerte para remover el H₂ o la remoción *in situ* del H₂ del biogás a través de membranas (Valdez & Poggi, 2009)

1.4 Microorganismos productores de Hidrógeno

El diseño y operación de los procesos en biotecnología ambiental son formas prácticas en las cuales la ecología microbiana es manipulada para que comunidades microbianas específicas logren objetivos particulares. En particular, la producción de hidrógeno como fuente de energía renovable presenta un buen ejemplo. Se han establecido diferentes métodos para la generación de hidrógeno biológicamente, incluyendo fotólisis directa e indirecta, fotofermentación y fermentación oscura. Basado en las velocidades de producción de hidrógeno, la fermentación oscura se destaca por ofrecer un excelente potencial para aplicaciones prácticas e integración con las tecnologías emergentes del hidrógeno (Levin *et al.*, 2004).

La operación exitosa de cualquier biorreactor para la fermentación oscura depende del desempeño de los microorganismos presentes en el sistema; por lo tanto entender la estructura de las comunidades productoras de hidrógeno es un paso crítico hacia la optimización de las comunidades microbianas y mejoramiento de la producción de hidrógeno.

En ocasiones, comunidades microbianas con el mismo perfil de composición resulta en diferentes rendimientos de producción de hidrógeno, indicando que la producción no cambia como respuesta a cambios en la comunidad microbiana, sino por la ruta metabólica seguida en respuesta a las condiciones ambientales (Hawkes *et al.*, 2002).

El proceso de la fermentación oscura para la producción de hidrógeno ha atraído mucha atención en años recientes porque puede ser integrada en el tratamiento de desechos orgánicos, y tiene la posibilidad de ser escalado para propósitos comerciales. Los lodos anaerobios son frecuentemente utilizados como inóculo en la producción de hidrógeno que usa desechos orgánicos como alimentación (Yang *et al.*, 2007). Hallenbeck & Ghosh 2009, dejan en claro que en el futuro la producción fermentativa de hidrógeno comercializado, será llevado a cabo bajo condiciones no estériles y haciendo uso de sustratos complejos. Así que el uso de un cultivo mixto o consorcio microbiano es una técnica que mejora la producción de hidrógeno ya que comunidades microbianas complejas contienen una gama de actividades hidrolíticas necesarias en este tipo de procesos además de ser potencialmente más robustas a los cambios en las condiciones de operación (Hung *et al.*, 2011).

Así como las tecnologías ya maduras de lodos activados y digestión anaerobia para el tratamiento de aguas residuales, la producción de hidrógeno usando cultivos mixtos fue demostrada antes de que los avances en biología molecular permitiera estudiar las comunidades microbianas responsables (Hawkes *et al.*, 2007). Muchos microorganismos son capaces de producir hidrógeno a partir de carbohidratos sin embargo a partir de técnicas moleculares se han identificado principalmente especies del género *Clostridium* (Lin *et al.*, 2006). Fang *et al.*, (2002) analizaron las especies presentes en un cultivo productor de hidrógeno (CSTR, pH 5.5, 36 °C, TRH 6.6h) a partir de glucosa. Ellos encontraron que el 64.4% de todos los clones presentes eran del género *Clostridia*, con 43.8% relacionado a *Clostridium cellulosi*, 12.5% relacionado a *Clostridium acetobutylicum* y 8.3 relacionado a *Clostridium tyrobutyricum*, el 18.8% de todos los clones fueron relacionados al género *Enterobacter* y 3.1% con *Streptococcus bovis*. Otro estudio de lodo granular (26 °C, pH 5.5, TRH 6h sucrosa como sustrato) mostró que el 69% de los clones estaban relacionados con cuatro especies del género *Clostridia* y 13.5% con *Sporolactobacillus racimecus* en el grupo *Bacillus/Staphylococcus*.

También se ha seguido la distribución de los metabolitos junto con la caracterización de las poblaciones microbianas. Con respecto a esto, los metabolitos más comúnmente formados durante la producción fermentativa de hidrógeno, son el acetato, propionato, butirato, etanol y butanol. De esta manera, varios autores han sugerido que las especies *Clostridia* son las dominantes en los sistemas de producción de H₂ (Lay, 2001) Otra forma indirecta de determinar la estructura microbiana es el método usado para el enriquecimiento del inóculo con productores de H₂. El tratamiento térmico por un lado y la operación acidogénica enriquecen el inóculo con bacterias formadoras de esporas relacionada con el género *Clostridia/Bacillus*. Esta idea fue corroborada por Liu & Fang, 2002 quienes usaron un microscopio electrónico de barrido (SEM) para observar la estructura de gránulos acidogénicos productores de hidrógeno. Las imágenes del SEM mostraron que los gránulos estaban formados típicamente por bacterias formadoras de esporas. (Valdez & Poggi, 2009).

1.4.1 Otros microorganismos

Diferentes estudios han mostrado que además de los microorganismos directamente involucrados en la producción de hidrógeno existen otros microorganismos que si bien no son productores de hidrógeno contribuyen a mantener las condiciones adecuadas para que se lleve a cabo dicha producción de hidrógeno, como la *Klebsiella* sp que remueve el oxígeno y mantiene condiciones anaerobias en el reactor o el grupo *Bacillus/Staphylococcus* el cual produce EPS y cuyo rol podría ser contribuir a la formación de gránulos o facilitar la colonización de superficies, y también coexisten microorganismos que por el contrario son inconvenientes para la producción de hidrógeno. La tabla 1.14 resume algunos estudios donde se reporta el rol de algunos microorganismos presentes en los sistemas de producción de hidrógeno por fermentación.

Tabla 1.14. Características filogenéticas y rol de microorganismos coexistiendo con los ya conocidos productores de H₂.

| Rol/Microorganismo | Taxonomía | Influencia en el proceso | Referencia |
|--|------------------------|---|--|
| Mejoramiento de la producción de H₂ por formación de gránulos/retención de biomasa | | | |
| <i>Sporolactobacillus racemicus</i> | Sporolactobacillaceae | La producción de sustancia polimérica extracelular podría ayudar en la formación granular | Fang <i>et al.</i> , 2002a |
| <i>Streptococcus</i> sp. | <i>Streptococaceae</i> | Aparece cuando se mejora la producción de H ₂ , pero aparentemente no es productor de H ₂ <i>Clostridium</i> sp. y <i>Streptococcus</i> sp. forman una estructura de malla durante la formación de gránulos. | Davila-Vazquez <i>Et al.</i> , 2009 Hung <i>et al.</i> , 2011 |
| Ambiente anaerobio por el consumo de Oxígeno | | | |
| <i>Enterobacter Aerogenes</i> | Enterobacteriaceae | Anaerobio facultativo que remueve el oxígeno y genera condiciones anaerobias para el <i>Clostridium</i> productor de H ₂ | Yokoi <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Klebsiella</i> sp. | Enterobacteriaceae | Podría significativamente reducir el potencial Redox generando condiciones anaerobias | Hung <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Bacillus</i> sp. | Bacillaceae | Disminución del oxígeno | Huang <i>et al.</i> , 2010 |
| Mejoramiento de la producción de H₂ por degradación de sustratos orgánicos complejos | | | |
| <i>Bacillus</i> sp. | Bacillaceae | Alta eficiencia de solubilización de compuestos sólidos | Ueno <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Bifidobacterium</i> sp. | Bifidobacteriaceae | Rompe el almidón en pequeñas moléculas y simplifica compuestos orgánicos que son usados por <i>Clostridium</i> sp. | Cheng <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Olsenella</i> sp. | Corobacteriaceae | | Lo <i>et al.</i> 2008 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | Enterobacteriaceae | Puede contribuir a la degradación de sustratos de carbono | |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | Pseudomonaceae | | |
| <i>Megasphaera</i> sp. | Veillonellaceae | Transformación del sustrato | Doi <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Cytophagales</i> str. | Cytophagaceae | | Lu <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Acetivibrio cellulolyticus</i> | Ruminococcaceae | Degradación de celulosa | Nisila <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Clostridium cellulosi</i> | Clostridaceae | | |
| <i>Clostridium stercorarium</i> | | | |
| Consumo de hidrógeno | | | |
| <i>Lactobacillus</i> sp. | Lactobacillaceae | Coexiste con <i>Clostridium</i> y puede tener un efecto adverso en la producción de H ₂ | Kawagoshi <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Sporolactobacillus</i> sp. | Sporolactobacillaceae | Puede excretar bacteriocidas | Saraphirom y Reungsang, 2010 |
| <i>Schwartzia succinivorans</i> | Veillonellaceae | Consumidor potencial de H ₂ | Koskinen <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Megasphaera sueciensis</i> | | | |
| <i>Bacillus recensilacticus</i> | Bacillaceae | Puede incrementar la concentración de lactato y disminuir la producción de H ₂ | Kim <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Prevotella</i> sp. | Prevotellaceae | Puede competir por sustrato y afectar la producción de H ₂ | Castelló <i>et al.</i> , 2009 |

1.5 Biopelículas

Una biopelícula puede ser definida como una comunidad microbiana caracterizada por células que se adhieren a un sustrato (superficie) o una interface y entre ellas mismas, embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares. (Shircliff *et al.*, 2002).

Existe suficiente evidencia para convencernos que en cualquier hábitat, natural, industrial o médico, la mayoría de las bacterias preferentemente colonizan superficies en comunidades organizadas en biopelículas en lugar de crecer individualmente en suspensión (Stickler, 1999). La idea de que las bacterias crecen preferentemente en superficies ha estado presente por más de 150 años. En 1947 Antonie van Leuwnhoek usó su microscopio primitivo para describir agregados de “animáculos” que desprendió de la superficie de dientes de humanos. Casi 100 años después Claude Zobell examinó poblaciones marinas naturales por microscopía directa, y concluyó que esas bacterias son atraídas a superficies a las cuales a veces se adhieren para formar poblaciones estables. En 1964, Ralph Mitchel y Kevin Marshall examinaron las primeras etapas de la formación de biopelículas por bacterias en cultivos puros, y distinguieron entre la adsorción reversible de las bacterias en la superficie y la subsecuente adhesión irreversible que constituye la primera etapa de la formación de la biopelícula (Costerton, 1999).

1.5.1 Formación de las biopelículas

La formación de las biopelículas, necesariamente, empieza con la adhesión de un pequeño número de bacterias a la superficie. Para que la bacteria se adhiera a la superficie, las células deben “sentir” su proximidad a esas superficies. Se propone que las bacterias plantónicas liberan protones y moléculas sensoras conforme se mueven a través de todo el fluido. Y se propone también que esos protones y moléculas sensoras como la acil homoserina-lactona (AHLs) en las Gram negativa (Stickler, 1999) se pueden difundir radialmente hacia superficies adyacentes o a cualquier otra superficie. Se propone que si la bacteria detecta una alta concentración de protones o moléculas sensoras del mismo lado donde ésta se encuentra, la bacteria puede “identificar” que está cerca de una superficie ya que la difusión se vio limitada en ese lado. (Costerton, 2009).

Un gran número de bacterias, se sabe, poseen un sistema quórum-sensing. Este sistema estimula una respuesta de autoinducción que ocurre cuando la bacteria responde a concentraciones de un compuesto secretado alcanzadas únicamente si la población microbiana colectivamente presenta una densidad crítica. La función de este sistema garantizar a una célula individual o una población de densidad crítica antes de inducir la expresión de funciones especializadas (Shircliff *et al.* 2002). Las bacterias de algunas especies recorren toda la superficie antes de establecerse en un lugar e iniciar su comportamiento de adhesión. Estas bacterias recorren toda la superficie aun cuando se encuentre poblada ya por bacterias de la misma especie, es por eso que forman monocapas en la superficie colonizada. Otras bacterias se mueven muy poco sobre la superficie antes de poder adherirse y otras forman agregados en lugares específicos y forman microcolonias.

Las bacterias adheridas deberán sintetizar exopolisacaridos para cimentar su adhesión a la superficie, y algunas otras bacterias en la biopelícula en desarrollo, para progresar de la adhesión reversible a la etapa de adhesión irreversible.

1.5.2 Estructura de las biopelículas

Revelaciones de la arquitectura básica de las biopelículas ha mostrado que la microcolonia es la unidad estructural básica de una biopelícula. Análisis estructurales han mostrado que las microcolonias son comunidades discretas de bacterias encerradas en una matriz que puede incluir también otras especies. Dependiendo de las especies involucradas, una microcolonia puede estar compuesta de 10-25% de células y una matriz del 75-90% de EPS (Sustancias Poliméricas Extracelulares) la cual casi siempre es más densa en el área más cercana al núcleo de la microcolonia. Un análisis cuidadoso de la estructura de muchas microcolonias casi siempre revela una forma de hongo. La mayoría de las células se

encuentra en la corona del hongo y muy pocas en el tallo. Las microcolonias están ordenadas de forma horizontal en biopelículas delgadas, aunque también pueden ordenarse de manera vertical en biopelículas gruesas (Costerton, 1999).

La estructura de una biopelícula madura variará con la ubicación, la naturaleza de los microorganismos constituyentes y la disponibilidad de nutrientes (Stickler, 2002).

Existen diferentes factores que influyen en la estructura de las biopelículas, algunos de ellos son listados en la tabla 1.15, no es fácil ubicar estos factores en orden de importancia y la búsqueda de un consenso acerca de que regula la estructura de una biopelícula puede ser infructuosa. La colonización inicial de una superficie, aunque restringida a un subconjunto de la población completa que puede colonizar superficies, será totalmente aleatoria, dependiendo en que se adhiere, dónde y cuándo. Una vez que los microorganismos se han adherido, cualquier posible interacción ocurrirá ya que este punto está gobernado no por el azar sino por una serie de reglas fisicoquímicas y biológicas. Dos microcolonias pueden competir, cooperar o ser independientes (Wimpenny *et al.*, 2000).

1.5.3 Biopelículas VS bacterias plantónicas

Las bacterias que desarrollan una biopelícula presentan ventajas frente a su contraparte las bacterias plantónicas, como la habilidad de capturar y concentrar a través de la matriz polimérica nutrientes como carbón, nitrógeno y fosfato. Permite la resistencia a diferentes estrategias de remoción, el uso de agentes de remoción y antimicrobianos, estrés por fuerzas de corte. Una biopelícula presenta la habilidad de actuar como barrera de difusión disminuyendo la penetración de algunos agentes antimicrobianos, las bacterias que crecen en forma de biopelícula tienen el potencial de dispersarse vía desprendimiento (Shirreff *et al.*, 2002). Crecer en forma de biopelícula es ventajoso para la comunidad como un todo, por ejemplo en la degradación de moléculas orgánicas recalcitrantes. Para la degradación de sustancias de este tipo, la interacción de diversas especies (co-metabolismo) es la manera más eficiente.

Una de las ventajas de estas asociaciones y agregados para la degradación, es su amplio uso en todos los tipos de tratamiento de aguas residuales, lodos activados, reactores de biomasa fija, y reactores UASB, por mencionar algunos (Wimpenny *et al.*, 2000)

Tabla 1.15. Factores que influyen la formación de biopelículas

| | |
|---------------------------|---|
| Factores Genotípicos | El genotipo específico del microorganismo Expresión de genes codificando propiedades de superficie Expresión de sistemas sensoriales Producción de EPS Dinámica de crecimiento del microorganismo: velocidad específica de crecimiento, periodos lag, afinidad por el sustrato, etc. Expresión de factores genéticos no directamente conectados a la formación de biopelículas (motilidad, quimiotaxis, genes de represión de catabolitos) |
| Factores fisicoquímicos | Interface de fase (combinación de sólido, líquido y gas) Composición de la superficie y rugosidad Composición del sustrato Temperatura, pH, presión, |
| Procesos estocásticos | Colonización inicial: adhesión y desprendimiento Cambios aleatorios en factores bióticos y abióticos |
| Fenómenos determinísticos | Interacciones específicas entre microorganismos: competición, neutralismo, cooperación y depredación. |
| Procesos mecánicos | Cortes debido a condiciones de flujo laminar o turbulento, abrasión, restricciones logísticas. |
| Importación – Exportación | Adición o remoción de componentes bióticos o abióticos, como la adición de arena, minerales o desechos orgánicos. |
| Cambios temporales | Cambios periódicos en el ambiente biótico o abiótico como la luz, temperatura, pH, etc. |

1.5.4 ¿Por qué biomasa fija?

Hasta hace poco los estudios de producción de H₂ en continuo, solo eran desarrollados en sistemas de biomasa suspendida, los reactores de agitación continua (CSTR), son el tipo de reactor más frecuentemente usado para la producción de H₂ en continuo (Roch, *et al.*, 2010). Sin embargo, este tipo de reactor usualmente exhibe un desempeño pobre en la velocidad de producción de H₂ debido a su incapacidad de mantener altos niveles de biomasa productora de H₂ a bajos tiempos de retención hidráulica debido a su estructura intrínseca (Zhang *et al.*, 2007)

La tendencia en nuestros días, es el uso de la tecnología de la inmovilización, debido a las ventajas que presenta en operación continua. Por ejemplo, hacen más fáciles operaciones de larga duración y la separación líquido-sólido. Además, la inmovilización disminuye los efectos inhibitorios de compuestos tóxicos, puede ayudar a la aclimatación de las bacterias y disminuye la fase lag del cultivo de las mismas (Bai *et al.*, 2009).

Para lograr una velocidad de producción de H₂ satisfactoria, los sistemas de biomasa inmovilizada se han convertido en alternativas populares a los sistemas de biomasa suspendida para la producción continua de H₂ ya que estos son capaces de mantener altas concentraciones de biomasa incluso a tiempos cortos de retención hidráulica. Estudios previos nos llevan a creer que las técnicas de inmovilización de biomasa como el encapsulado y la adhesión mejoran la retención celular y por lo tanto la velocidad de producción de H₂.

Estudios recientes encontraron una producción favorable de H₂ usando reactores con biomasa inmovilizada, como los UASB (Upflow anaerobic sludge blanket), CSTR (granule-based continuous stirred tank reactor), de lecho fijo, AFBR (anaerobic fluidized bed reactor), y biofiltros. Estas técnicas de inmovilización de biomasa están basadas principalmente en la granulación y en biopelículas. Y como consecuencia de la alta retención de biomasa se encontraron mejores velocidades de producción de H₂ (Zhang *et al.* 2008).

Además de los parámetros del proceso de producción de H₂, la configuración del reactor es uno de los aspectos más importantes que influencia el desempeño del proceso de producción de H₂ y el tratamiento del agua residual. La configuración del reactor tendrá influencia directa en el microambiente del mismo, como la población microbiana, el comportamiento hidrodinámico, el contacto sustrato-consorcio, etc. (Lalit *et al.*, 2009).

En resumen, las ventajas de los sistemas de biopelícula son:

Una mayor cantidad de biomasa pudiendo tratar aguas residuales con alta carga orgánica.

Actúan como buffer y reducen la concentración de tóxicos.

Mejor tratamiento de agua residual con compuestos de difícil biodegradación.

Aumenta la supervivencia de los microorganismos.

Protege las células de depredación por otros organismos.

Más resistentes a cambios en los parámetros del proceso.

El tiempo de retención hidráulica puede ser acortado: puede permitir la biodegradación en continuo

La retención pobre / lavado celular, generalmente observado en sistemas de crecimiento suspendido, puede ser evitado en sistemas de biopelícula.

1.6 Reactores con biomasa fija

Los reactores con biomasa fija son usados en situaciones donde la capacidad obtenida del reactor de biomasa suspendida está limitada por la concentración de la biomasa y el tiempo de retención hidráulica. Este puede ser el caso cuando se trabaja con microorganismos de lento crecimiento, los cuales crecen en suspensión requiriendo de tiempos largos de retención, o cuando se tiene alimentaciones diluidas en las cuales se alcanza una muy baja concentración de biomasa. En estos casos, las biopelículas son una solución efectiva para la retención de la biomasa mejorando la capacidad de conversión volumétrica del reactor.

Los agregados de células microbianas, como los flóculos y biopelículas, son de gran interés en biotecnología. Estos ofrecen ventajas con respecto a las células que crecen de forma suspendida, como una más fácil separación bacterias-líquido, por sedimentación o filtración. Los agregados microbianos, ya sea en la forma de biopelículas, gránulos o flóculos, y el medio, constituyen dos fases diferentes. Esta característica clave tiene tres consecuencias principales:

1. La retención de la biomasa puede ser usada para mejorar la capacidad de conversión volumétrica del reactor cuando la conversión está limitada por la cantidad de biomasa presente. Si no se aplica la retención de la biomasa, la concentración de la biomasa depende únicamente de la concentración del sustrato en la alimentación y por consecuencia se requieren de largos tiempos de retención cuando se trata de alimentaciones diluidas. Dependiendo de las características de sedimentación de los agregados, la biomasa puede ser fácilmente separada del líquido y retenida en el reactor.
2. El sustrato tiene que cruzar la interfase líquido-agregado y ser transportado a través del agregado, alcanzar los microorganismos y ser consumido. Este transporte es en general por difusión a través del agregado y resulta en un gradiente de concentración. La profundidad de penetración de los sustratos en una biopelícula depende principalmente de la porosidad de la biopelícula, concentración del sustrato, la transferencia de masa en la interface biopelícula-líquido y la velocidad de reacción en la biopelícula.
3. Debido al gradiente de concentración en la biopelícula, existe también un gradiente de crecimiento en la biopelícula. Esto producirá biopelículas con diferentes capas, donde los microorganismos con la tasa de crecimiento más alta se encontraran en el exterior de la biopelícula mientras que los de lento crecimiento se encontraran en el interior (Nicollela *et al.*, 2000).

CAPÍTULO 2

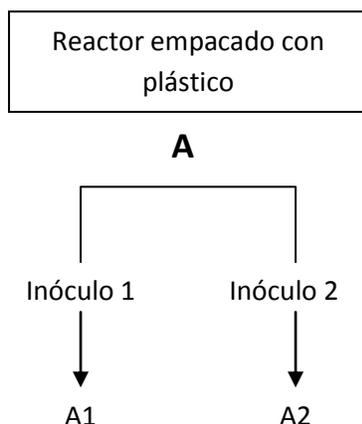
METODOLOGÍA

2.1 Estrategia experimental

A continuación se describen las etapas utilizadas en este estudio:

- 1) Colonización de empaques para poner a punto los métodos analíticos: colonización de empaques, cuantificación de la producción de H_2 , CO_2 y CH_4 , AGV's, consumo de glucosa, DQO y determinación de la concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV). (Ver punto 2.8)
- 2) Puesta en marcha de dos reactores de 8 L de volumen total y 4L de volumen útil, empacados con un tipo diferente de empaque cada uno, se evaluó la colonización de los empaques, la producción de hidrógeno, el consumo de glucosa y la producción de AGV's , a 37 °C en operación discontinua. La glucosa alimentada fue de 3g/L. El pH inicial fue de 7 y no se controló por lo que al final llegaba a 4.7. Estos reactores fueron operados durante 2 meses con un TRH de 48h.
- 3) Se realizó una réplica de los experimentos usando un inóculo diferente, proveniente de un reactor discontinuo que trata las aguas residuales de una cervecería ubicada en Guadalajara, Jal.
- 4) Se evaluó la influencia de la alcalinidad del medio sobre la producción de H_2 .

De esta manera la nomenclatura para los experimentos queda de la siguiente manera



Para el reactor empacado con empaque cerámico únicamente cambiará la A por B.

2.2 Inóculo

Se usó lodo granular anaerobio. Los lodos fueron pretratados térmicamente a 104 °C durante 24h para inhibir las bacterias consumidoras de hidrógeno y cosechar a las formadoras de esporas productoras de hidrógeno (Van Ginkel et.al. 2001). Después del tratamiento térmico, el lodo fue pulverizado en un mortero y almacenado hasta su uso. El polvo obtenido de esta forma, fue utilizado como inóculo en cada uno de los reactores en una concentración de 3 g/L.

Para evaluar el efecto del inóculo sobre la producción de H_2 se utilizaron dos inóculos diferentes. El inóculo 1 extraído de un reactor UASB que trata las aguas residuales de una industria cervecera en Toluca, Mex., y el inóculo 2 de también de un reactor UASB que trata las aguas residuales de una industria cervecera en la ciudad de Guadalajara, Jal.

2.3 Medición del biogás

El biogás producido fue medido usando el método de desplazamiento de agua, por medio de un dispositivo de Mariotte.

2.4 Pruebas de colonización de los empaques

Se evaluaron dos tipos de soporte comerciales para la inmovilización de la biomasa, uno cerámico ($230 \text{ m}^2/\text{m}^3$) y uno de polietileno ($963 \text{ m}^2/\text{m}^3$) (Figura 2.1). Las pruebas fueron realizadas usando una concentración de glucosa de 3 g/L como sustrato, y se ajustó el pH inicial del medio a 5.5 y una temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$.

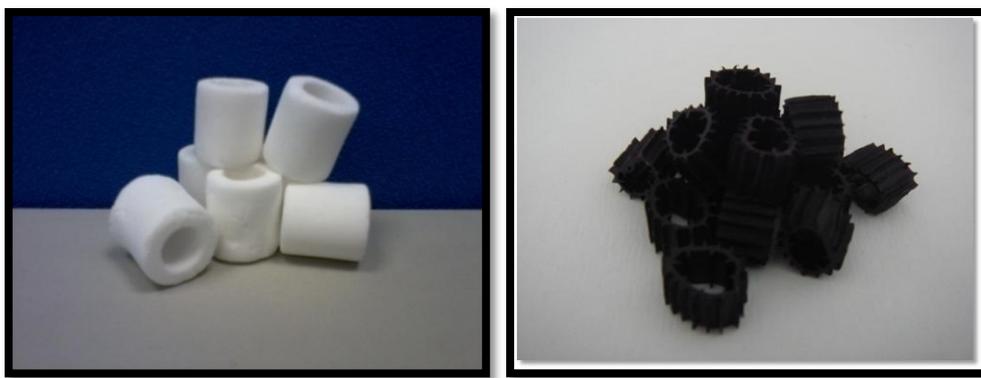


Figura 2.1. Soportes para pruebas de colonización. Izq: cerámico Der: HDP

Dichas pruebas fueron realizadas en matraces erlenmeyer de un litro (Figura 2.2). En cada matraz se agregaron 750 mL de medio mineral de acuerdo con Mizuno et.al.(2000) y glucosa como sustrato en una concentración de 3 g/L .

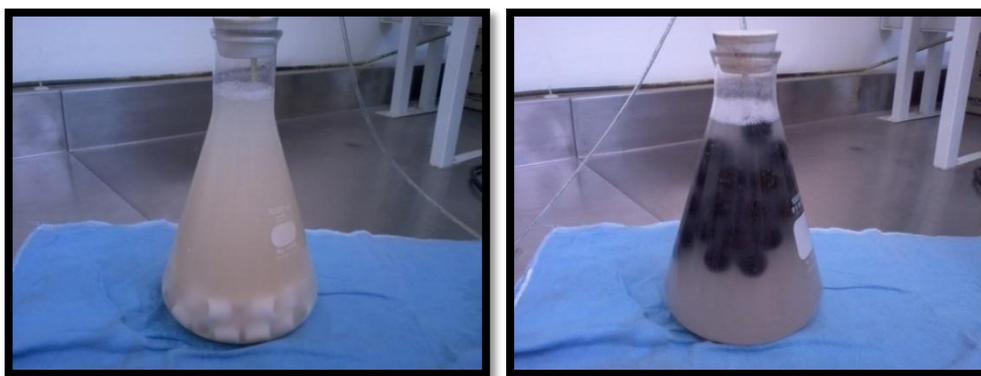


Figura 2.2. Pruebas de colonización

Ambos matraces fueron colocados en un baño a temperatura constante de $35 \text{ }^\circ\text{C}$, el pH de operación se ajustó manualmente a 5.5 al inicio de cada ciclo, que fue de 24h. Las muestras del biogás se tomaron al final de cada ciclo y fueron almacenadas en tubos de ensayo llenos con una solución salina a un pH de 2.5 para su posterior análisis. Para la evaluación de la colonización de los soportes, se tomaron soportes de cada tipo semanalmente.

2.5 Operación de los reactores

Se emplearon dos reactores de lecho fijo operados en paralelo, empacados con un soporte plástico (Reactor A) (polietileno, 963 m²/m³) para desarrollar una biopelícula delgada y un soporte cerámico poroso (Reactor B) (silicato, 230 m²/m³) para desarrollar una biopelícula gruesa. El medio de soporte y el inóculo se pusieron en contacto desde el arranque de los reactores; los reactores fueron operados durante dos meses. Para cada configuración se hicieron dos experimentos. Cada análisis se hizo por triplicado.

Ambos reactores fueron operados hasta que se observó una producción constante de biogás. Los micronutrientes necesarios fueron agregados a través de una solución mineral conteniendo por cada litro: 250 mg K₂HPO₄, 520 mg NH₄Cl, 0.5 mg MnCl₂·4H₂O, 25 mg MgCl₂·6H₂O, 25 mg FeSO₄·7H₂O, 12.5 mg CoCl₂·6H₂O, 2.5 mg Na₂MoO₄·2H₂O, 2.5 mg H₃BO₄, 2.5 mg NiCl₂·6H₂O, 2.5 mg ZnCl₂. Los experimentos fueron realizados en reactores de 8L con un volumen útil de 4L. El tiempo de vaciado fue de 5 min, llenado 10 min. y tiempo de reacción 23.75 h, dando un tiempo total de ciclo de 24h. El volumen de intercambio en ambos reactores fue de 2L (50%). El tiempo de retención hidráulica (TRH) fue calculado en base al volumen de intercambio, por lo que se tenía un TRH de 48h. La temperatura fue controlada en 35°C a través de una chaqueta en el reactor A y de un serpentín, por el que circulaba agua caliente en el reactor B, el pH solo se ajustaba al inicio de cada ciclo con HCl 2N o NaOH 2N.

2.6 Análisis cinético

Se realizó un análisis cinético de la producción acumulativa de H₂ para cada uno de los experimentos a partir de los datos experimentales obtenidos. Cada gráfica representa el promedio de tres experimentos de la producción de H₂ durante el tiempo de reacción. Para realizar el análisis se utilizó la ecuación modificada de Gompertz. Esta ecuación ha sido ampliamente usada para modelar datos de la producción de gas. (Davila-Vazquez *et al.*, 2008; Buitrón y Carvajal, 2010):

$$H(t) = H_{max} * \exp \left[-\exp \left(\frac{2.71828 * R_{max} (\lambda - t)}{H_{max}} + 1 \right) \right]$$

Donde

H(t) (mL) es la cantidad total producida de H₂ al tiempo de cultivo t(h)

H_{max} (mL) es la cantidad máxima producida de H₂

R_{max} (mL/h) es la velocidad máxima de producción de H₂

λ (h) es el tiempo lag antes de la producción exponencial de H₂

2.7 Evaluación del efecto de la alcalinidad sobre la producción de H₂

Se utilizaron dos reactores de acrílico de 6.35 cm de diámetro y una altura de 50 cm de un volumen total de 1298 mL con un volumen útil de 750 mL empacados hasta una altura de 8 cm del fondo con empaque de polietileno. Se alimentaron con agua residual sintética a base de glucosa, 3g/L. El volumen de intercambio fue de 500 mL. El inóculo utilizado para esta prueba fue el 2, proveniente de un reactor UASB que trata las aguas residuales de una industria cervecera en la ciudad de Guadalajara, Jal.

2.8 Técnicas analíticas

2.8.1 Cuantificación de H₂, CO₂ y CH₄

La muestra de biogás fue colectada por medio de una jeringa succionando y desplazando el gas por lo menos dos veces para homogenizar la atmósfera en la probeta de almacenamiento del biogás. Una vez homogenizado se tomaron 10 mL de muestra e inmediatamente se inyectaron al cromatógrafo de gases.

Se utilizó un cromatógrafo de gases SRI provisto con un detector de conductividad térmica (TCD) y una columna de sílica gel de 1.82m en serie con una columna de tamiz molecular 13x de 1.82m y un diámetro de 3.175 mm que trabajó a 40°C durante 4 minutos y después se calentó a 110°C con un incremento de 20°C/min. El gas portador utilizado fue nitrógeno con un flujo de 20mL/min. La temperatura del inyector fue de 90°C y del detector de 150°C. Los datos de área obtenidos fueron cotejados con la curva patrón realizada para cada gas y así poder determinar la composición del biogás.

2.8.2 Ácidos grasos volátiles y solventes

Para el análisis de los AGV's y solventes, 1 mL de muestra fue centrifugado durante 5 min a 3500 rpm. Para la determinación cuantitativa de los AGVs y solventes (ácido acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico y valérico) se utilizó un cromatógrafo de gases (Varian) equipado con un detector de ionización de flama FID y una columna capilar de sílice Zebram ZB-FFPA de 0.53 (mm) de diámetro, 15 m de largo y 1 µm de espesor de película, con las siguientes condiciones de operación: temperatura inicial de horno en 55°C, se mantiene 3 min aumentando a 135 °C a una tasa de 45°C/min, temperatura del inyector, 190°C; temperatura del detector, 210°C; el gas portador fue, nitrógeno. Las áreas arrojadas por el sistema se compararon con las curvas de calibración a partir de las cuales se calculó la concentración de los AGVs y solventes.

2.8.3 Determinación de la colonización de los empaques

Para cuantificar la colonización de los empaques se hizo una relación de SSV vs absorbancia. De una solución de concentración conocida de SSV se prepararon soluciones en un rango de 0-200 mgSSV/L, de cada una de las soluciones se tomó una muestra y se trató de acuerdo al método para la determinación de proteína de Lowry, cada una de las concentraciones mostró una coloración diferente, inherente al contenido de proteína y por lo tanto una absorbancia diferente, ésta entonces se relacionó con el contenido de SSV. Así, los empaques fueron tomados del reactor, colocados en tubos y sonicados durante 30 minutos, una vez realizada la sonicación se tomó una muestra de 2 mL y se determinó el contenido de proteína mediante el método de Lowry. Los 2 mL de muestra se colocan en un tubo hach y se agregan 6 mL de una solución de dodecilsulfato de sodio y sulfato de cobre entre otros reactivos, se agita y se deja reposar durante 30 min; después de este tiempo se agregan 0.6 mL de una solución de folin-ciocalteu se agita y se deja reposar durante 45 min, después de este tiempo se lee la absorbancia a 660 nm. Antes de cada experimento se ajusta el equipo con un blanco empleando agua destilada en lugar de la muestra (Lowry *et al.*, 1951) y por la relación se determinó el contenido de SSV en los empaques (Figura 2.3) y al dividir entre el área superficial de los empaques se tuvo la relación SSV/m².

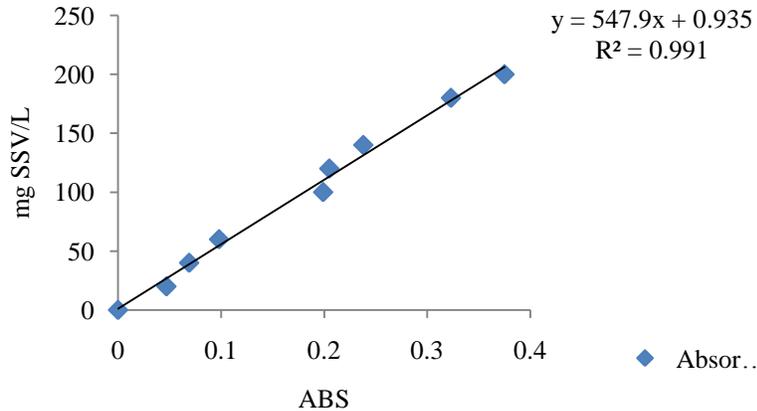


Figura 2.3 Relación de entre absorbancia y concentración de SSV

2.8.4 Glucosa

Se tomó una muestra del reactor a intervalos previamente establecidos; la muestra se centrifugó, filtró y se ajustó el pH a un valor menor a 3 con ácido sulfúrico para detener la actividad microbiana. Se tomaron 0.5 mL para realizar el análisis de contenido de carbohidratos por el método colorimétrico para la determinación de azúcares (Dubois *et al.*, 1956). Los 0.5 mL de muestra se colocan en un tubo hach y se agregan 0.5 mL de una solución de fenol al 80% se agita y se agregan 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado, se deja enfriar durante 10 min y se lee la absorbancia a 720 nm. Para ajustar el equipo se corre un blanco antes de cada experimento usando agua destilada en lugar de la muestra.

2.8.5 Demanda química de oxígeno

Para su determinación se utilizaron tubos HACH con dicromato de potasio y ácido sulfúrico en un rango de 0 – 1500 mg DQO/L. A cada vial se le adicionaron 0.2mL de la muestra.

Se colocaron los tubos dentro del reactor HACH precalentado a una temperatura de 150 °C, se efectuó la digestión por 2 horas. Después de las 2 horas se apagó el reactor y los tubos se dejaron enfriar por 20 minutos. De nuevo se mezcló la solución, invirtiendo los tubos cuidadosamente y se leyeron en el espectrofotómetro HACH a 620 nm. Se utilizó un blanco agregando a un tubo HACH 0.2 mL de agua destilada. El resultado obtenido está en unidades de mg O₂/L.

2.8.6 Sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos

La determinación de los sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos se realizó por métodos gravimétricos.

Para la determinación de los sólidos suspendidos, volátiles y fijos se preparó el filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/A), enjuagándolo con agua destilada y aplicando vacío en el embudo de filtración, hasta eliminar totalmente el agua en exceso. Se dejó secar en estufa a 105 °C por una hora, se dejó enfriar en el desecador por 20 min y luego se pesó en la balanza analítica.

Una vez que se obtuvo el peso constante del filtro, se colocó en el embudo de filtración y se mojó el filtro con una pequeña cantidad de agua destilada. Se tomó un volumen de 10 mL de la muestra homogenizada, vertiendo el volumen en el embudo de filtración y se aplicó vacío hasta eliminar totalmente el exceso de agua. Usando un soporte de aluminio se pone a secar en la estufa a 105 °C por una hora, se dejó enfriar en el desecador durante 20 min y se registró su peso, obteniendo así los datos para el cálculo de los sólidos suspendidos totales.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Pruebas de colonización del medio de soporte en los matraces

La figura 3.1 muestra la colonización de los empaques en función del tiempo, ambos tipos de empaque alcanzan una colonización máxima alrededor del día 20, después de este día la cantidad de biomasa en los empaques empieza a disminuir lo que puede ser atribuido al desprendimiento natural de la biopelícula.

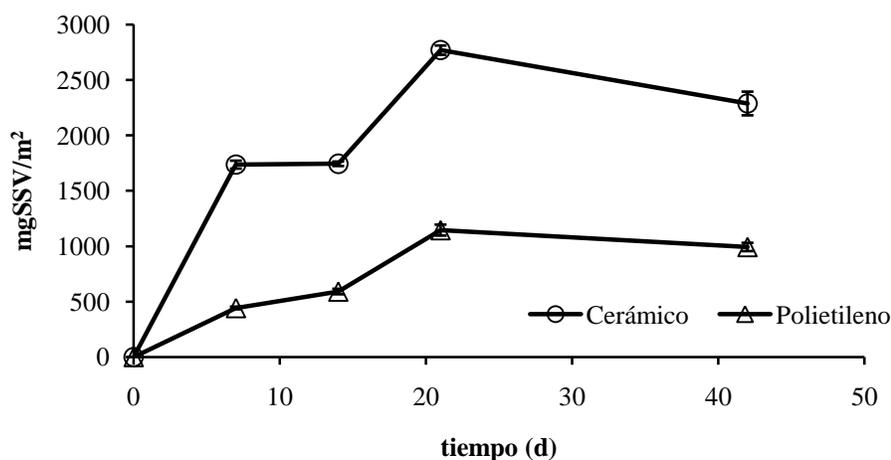


Figura 3.1. Colonización de empaques

La figura 3.2 muestra la producción de H_2 durante las pruebas de colonización del medio de soporte, se puede observar que el rendimiento alcanzado fue de $0.8 \text{ mol } H_2 / \text{mol}$ de glucosa para ambos reactores, con esto se confirma que la biomasa utilizada en las pruebas de inmovilización era efectivamente biomasa productora de H_2 .

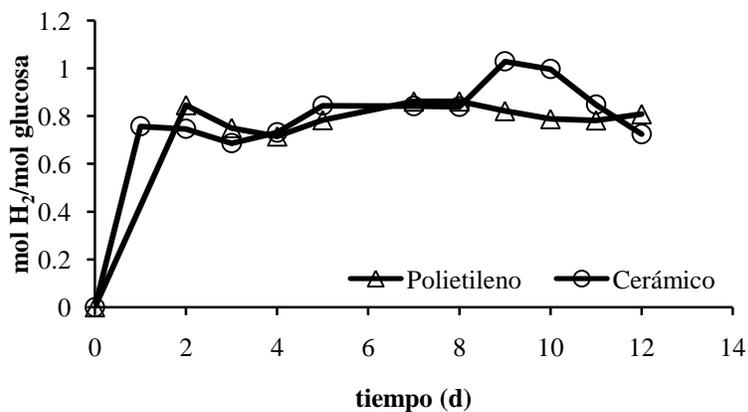


Figura 3.2. Producción de H_2 durante las pruebas de colonización en los matraces.

En esta etapa del experimento se pudo determinar que era posible la inmovilización de la biomasa productora de H₂ en los empaques propuestos para los experimentos, asimismo se pudo determinar a partir de qué día los empaques alcanzan la mayor colonización bajo las condiciones de operación establecidas. Se puede notar que el empaque cerámico mostró una mayor capacidad de inmovilización de biomasa que el empaque plástico, este resultado es similar a lo reportado por Rocha *et al.* 2010. Sin embargo no hubo una diferencia en la producción de H₂ y esto se debe a que la concentración de biomasa en cada uno de los matraces era la misma (3 g/L).

3.2 Evaluación de la producción de Hidrógeno en el reactor empacado con medio de soporte de polietileno

La activación y aclimatación del inóculo en el reactor empacado con medio de soporte plástico se realizó utilizando agua sintética a base de glucosa. Se consideró una aclimatación completa cuando se obtuvo un volumen y composición constante del biogás. En la figura 3.3 se muestra la producción de biogás y su composición en función del tiempo.

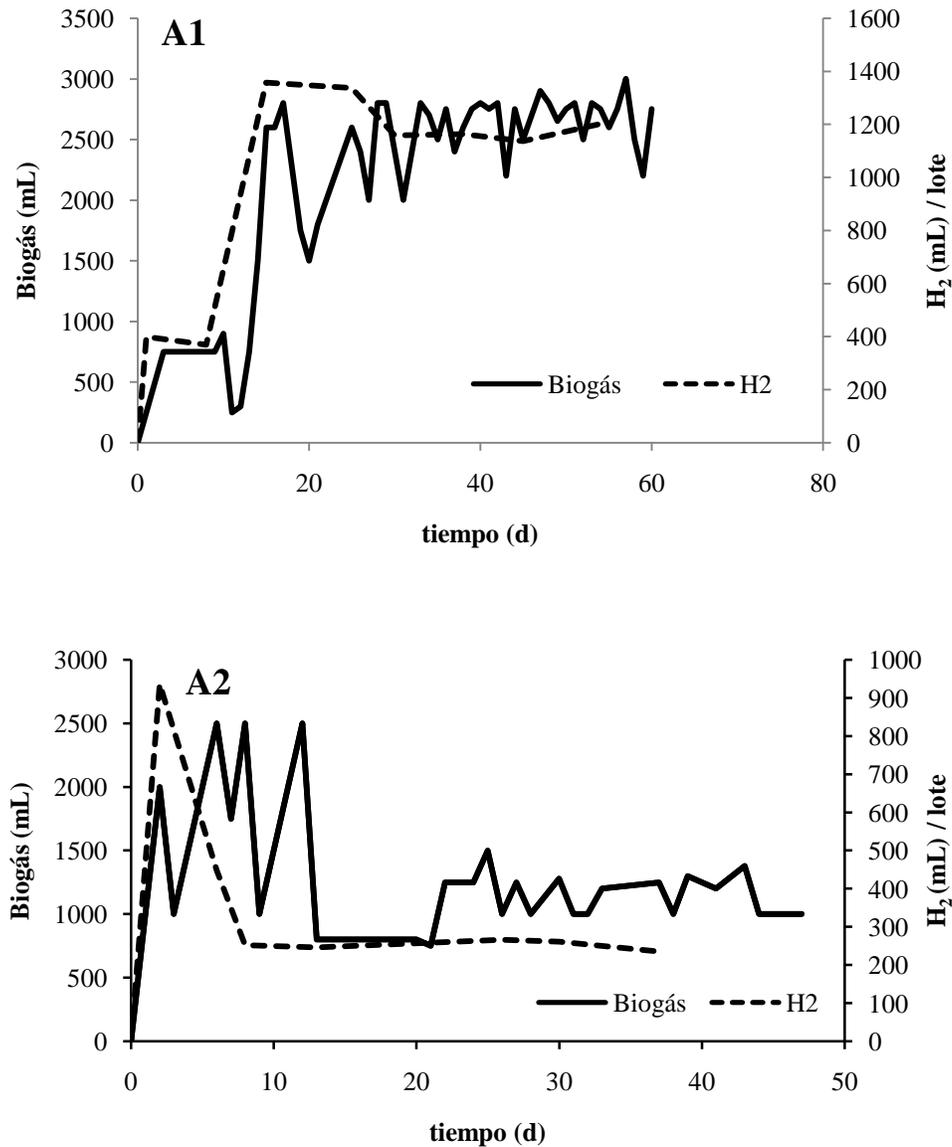


Figura 3.3. Producción de biogás e hidrógeno en función del tiempo de operación. Experimento A1 y A2

3.3 Contenido de H₂

Se observa una diferencia en la producción de biogás y por lo tanto en la de hidrógeno entre el experimento 1 y 2, esto se atribuye principalmente a la diferencia entre el inóculo 1 y el inóculo 2, aun cuando el inóculo 2 estuvo almacenado durante un año, presentó prácticamente la misma actividad metanogénica que el inóculo 1, 0.43 y 0.44 gDQO CH₄/gSSV-d para el inóculo 1 y 2 respectivamente, de acuerdo con esto se propone que el inóculo 2 estuvo compuesto por un consorcio más especializado en la producción de CH₄. El volumen de biogás por lote en el experimento A1 fue de 2636.2 ± 227 mL y en el experimento A2 se obtuvo un volumen por lote de 1113 ± 192 mL, en ambos casos compuesto únicamente de CO₂ y H₂. El porcentaje más alto de H₂ alcanzado en cada uno de los experimentos después de alcanzar la estabilidad fue de 51% y 21% respectivamente. La figura 3.4 muestra la cinética de un ciclo de operación del reactor A, la mayor velocidad específica de producción de hidrógeno en ambos experimentos se encontró entre las 5 y 15 h de operación siendo para el experimento A1 de 21.16 mL H₂ h⁻¹ gSSV⁻¹ mientras que en el experimento A2 fue de 9.14 mL H₂ h⁻¹ gSSV⁻¹.

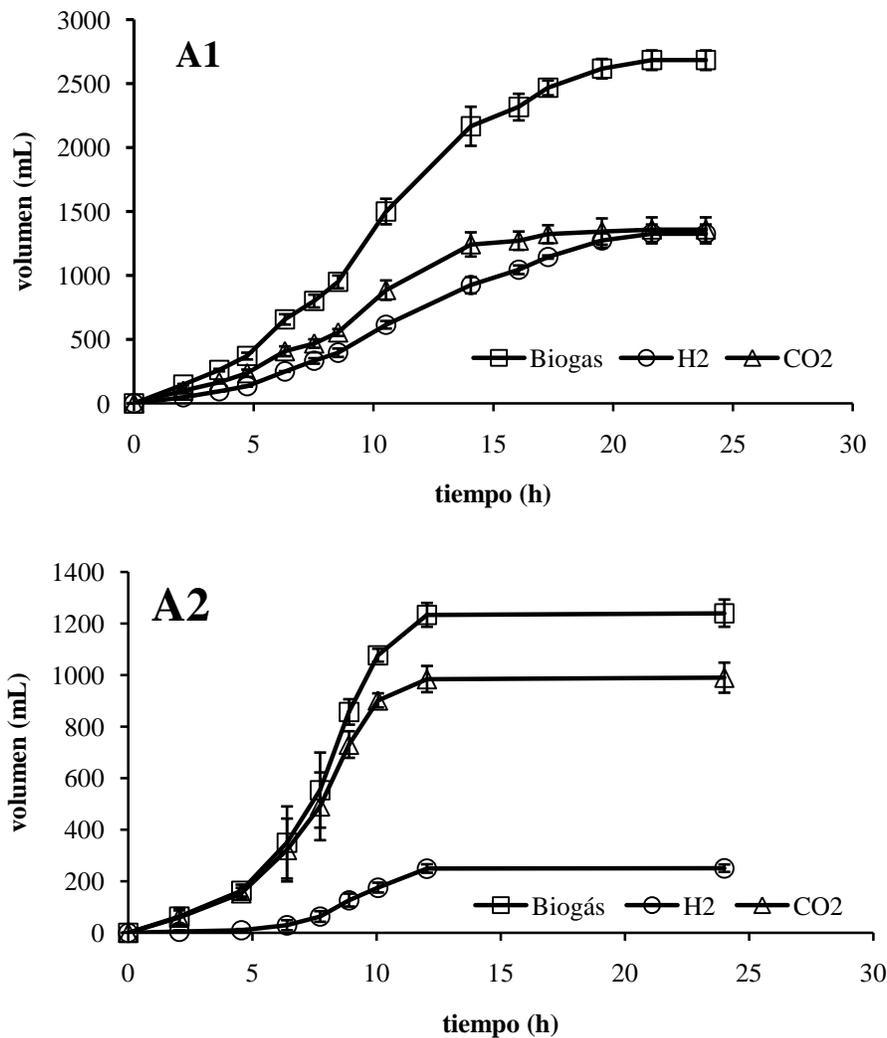


Figura 3.4. Cinética del reactor A, experimento A1 y A2 durante la producción de H₂

La diferencia en la producción de H_2 puede deberse a la generación de productos reducidos de la fermentación en el experimento B1, como el ácido propiónico, lo cual puede ser el resultado de un cambio en el metabolismo de las especies del consorcio microbiano o un cambio en la abundancia de las especies homoacetogénicas o productoras de propionato. Iyer *et al.*, (2004) siguió el cambio de una población microbiana productora de hidrógeno. Realizó estudios en un CSTR operado a pH de 5.5 alimentado con glucosa. A un TRH de 10 h solo se detectaron microorganismos del género *Clostridiaceae* mientras que a 30 h la población fue más diversa incluyendo microorganismos del género *Bacillaceae* y *Enterobacteriaceae*. Con base en esto, es posible que en el reactor de empaque cerámico se haya desarrollado una población más diversa debido a las características de la biopelícula favorecido por un TRH largo (48 h).

La figura 3.5 muestra el ajuste de los datos experimentales para cada experimento en el reactor A usando la ecuación modificada de Gompertz (véase punto 2.6).

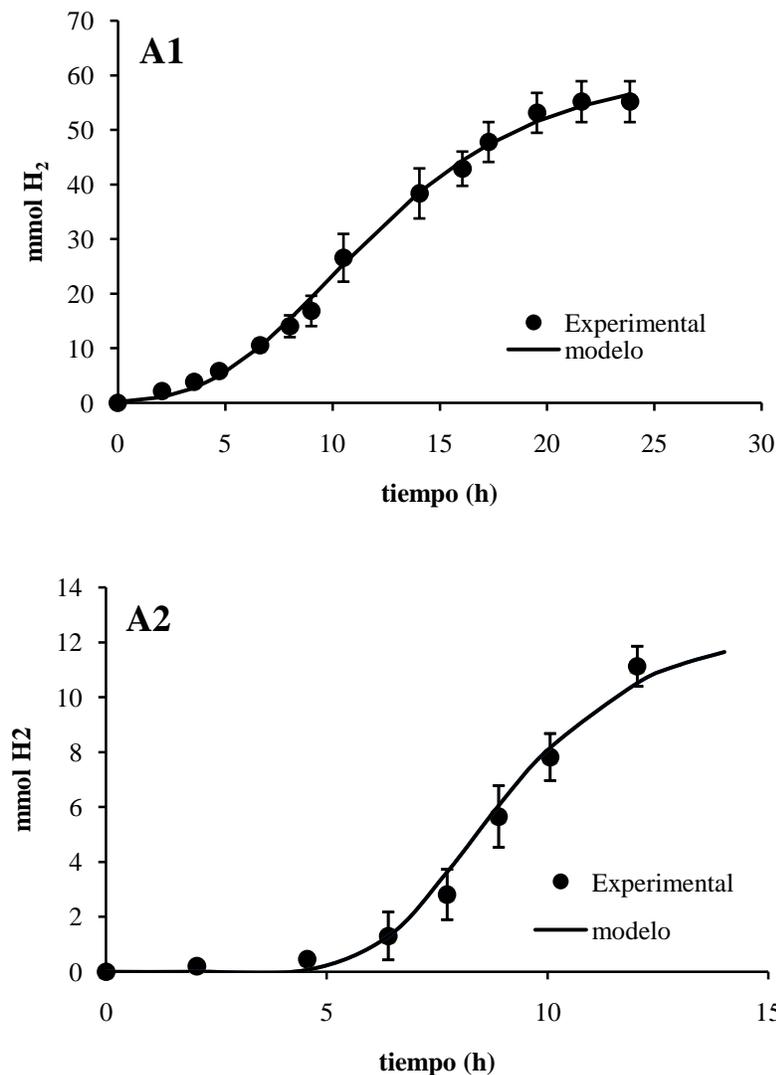


Figura 3.5. Ajuste de los datos experimentales del reactor A por la ecuación de Gompertz

La tabla 3.1 resume los parámetros de ajuste de la ecuación de Gompertz

Tabla 3.1. Parametros de ajuste de la ecuación de Gompertz para el reactor A

| | H_{\max} | R_{\max} | λ |
|-----------|-----------------|-----------------|------------------|
| Condición | mmol H_2 | mmol H_2 /h | h |
| A1 | 61 ± 6.42 | 4.1 ± 0.208 | 4.3 ± 0.0305 |
| A2 | 12.5 ± 0.28 | 2.1 ± 0.2 | 6 ± 0.05 |

Como lo muestran los resultados, en el experimento A1 se alcanzó prácticamente el doble de la producción de H_2 de lo producido en el experimento 2, esto se atribuye a las diferencias entre el inóculo 1 e inóculo 2 lo cual también se ve representado en el tiempo lag (4 y 6 h respectivamente), es decir se requirió un mayor tiempo durante el experimento A2 para que la biomasa empezara a producir H_2 después de ser alimentada.

Las velocidades máximas de producción para el A1 y A2 fue de 91.78 y 47.01 mL H_2 /h respectivamente. Para determinar el tiempo al cual ocurre esta velocidad máxima de producción de H_2 se calcula la derivada de la ecuación de Gompertz y entonces se obtiene lo siguiente (figura 3.6)

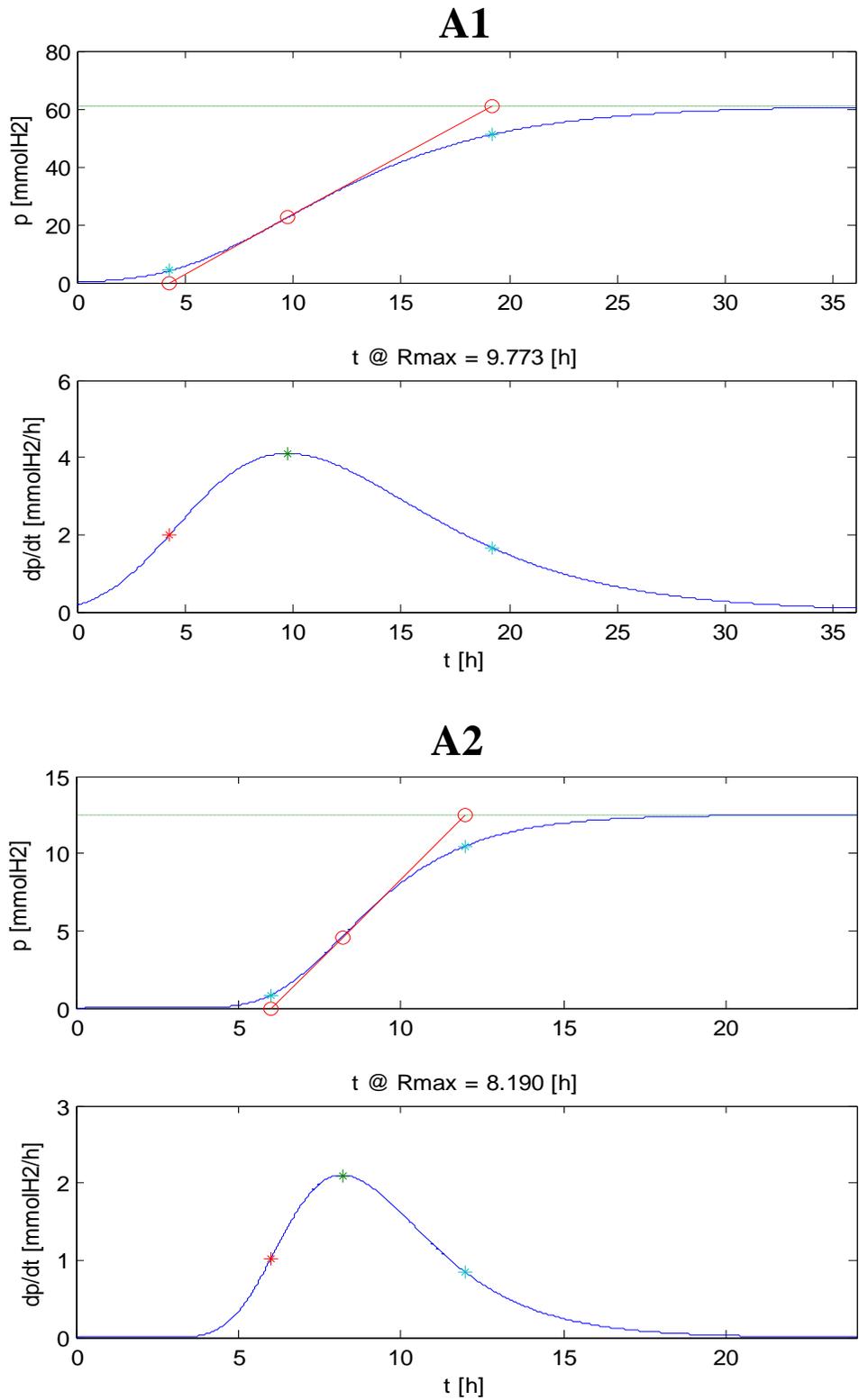


Figura 3.6. Tiempo al cual ocurre la máxima velocidad de producción de hidrógeno durante los experimentos A1 y A2

El tiempo al cual ocurre la velocidad máxima de producción de H₂ para el experimento 1 en el reactor A, A1 fue de 9.773 h y para el experimento 2, A2, de 8.19. Es notorio que aun cuando las producciones son diferentes el tiempo al cual ocurre la velocidad máxima de producción son cercanas.

3.4 Ácidos grasos volátiles

Como lo muestra la figura 3.7 durante el experimento A1 los principales subproductos fueron el ácido acético y butírico, mismos que están relacionados con la producción de hidrógeno a través de las siguientes reacciones (ec. 3.1, 3.2):



En menor cantidad también se obtuvo la producción de ácido propiónico e isobutírico.

Teóricamente se pueden producir 4 moles de hidrógeno por cada mol de glucosa cuando el producto final de la fermentación es el ácido acético (ec. 13) y 2 moles de hidrógeno cuando el producto final de la fermentación es el ácido butírico (ec.14), ambas reacciones llevadas a cabo por el género clostridia. Aunque varios microorganismos son capaces de producir hidrógeno a partir de carbohidratos, se han identificado, a través de técnicas moleculares, principalmente especies de este género como las predominantes en consorcios microbianos productores de hidrógeno (Lin *et al.*, 2006). Sin embargo, la versatilidad de este grupo de microorganismos en cuanto al consumo de carbohidratos que incluye el almidón, celulosa y hemicelulosa, le permite también tener flexibilidad en las rutas metabólicas permitiendo un amplio rango de productos finales de la fermentación lo que lleva a valores menores que los teóricos de producción de hidrógeno (Hawkes *et al.*, 2007). Este comportamiento puede explicar los resultados ilustrados en el experimento A2, donde además de ácido butírico y acético, se obtuvo también ácido propiónico y valérico lo que condujo a una menor producción de hidrógeno.

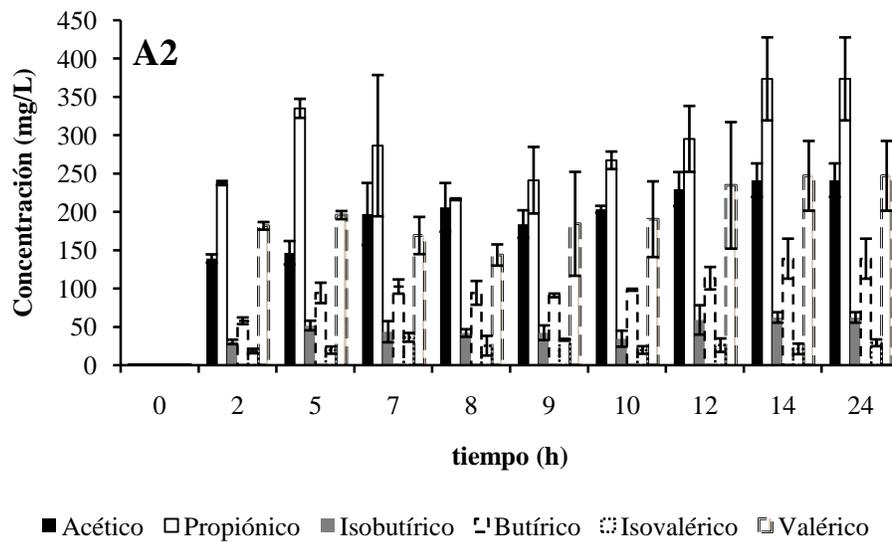
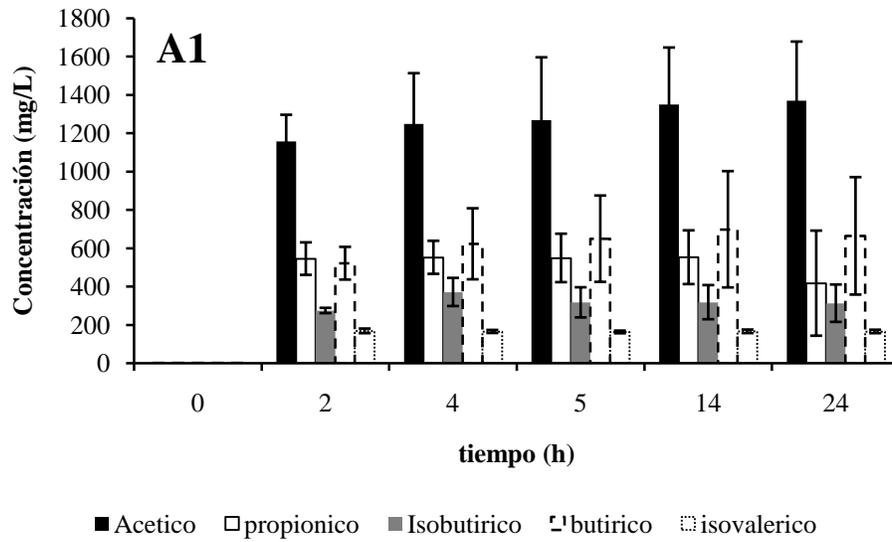


Figura 17. Productos finales de la fermentación durante la producción de hidrógeno durante los experimentos A1 y A2

La tabla 3.2 resume las cantidades de los productos finales de la fermentación para cada uno de los experimentos en el reactor A.

Tabla 3.2. Productos principales al final de la fermentación durante la producción de hidrógeno en el reactor A1 y A2

| Compuesto | Concentración (mg/L) | |
|---------------|----------------------|----------|
| | A1 | A2 |
| Ácidos | | |
| Acético | 1369 ± 308 | 241 ± 21 |
| Propiónico | 416 ± 274 | 373 ± 54 |
| Isobutírico | 312 ± 97 | 62 ± 6 |
| Butírico | 663 ± 306 | 138 ± 84 |
| Isovalérico | 164 ± 9 | 29 ± 4 |
| Valérico | -- | 246 ± 45 |
| Total | 2924 | 1089 |

El ácido propiónico y valérico no están en la ruta metabólica que lleva a la producción de hidrógeno (Jianzheng *et al.*, 2008) de esta manera, su producción lleva a una menor producción de H₂, sin embargo, el ácido propiónico puede ser producido por las mismas bacterias productoras de hidrógeno (clostridia) o por bacterias competidoras en el consorcio microbiano (Hawkes *et al.*, 2007) ya que se ha visto que el tratamiento térmico del inóculo reduce de manera considerable el número de bacterias productoras de ácido propiónico pero no las elimina completamente y pueden crecer cuando se tienen TRH's altos. *Selenomonas* spp. y *propionicbacteria*, son no formadoras de esporas y son los grupos de bacterias normalmente encontradas en los cultivos mixtos productores de H₂ (Kim *et al.*, 2008). Además, un estudio ha demostrado que las bacterias productoras de ácido propiónico son capaces de inhibir a otros microorganismos secretando sustancias bactericidas (Holo *et al.*, 2002) todo esto redundando en una baja eficiencia en cuanto a la producción de H₂.

3.5 Consumo de glucosa

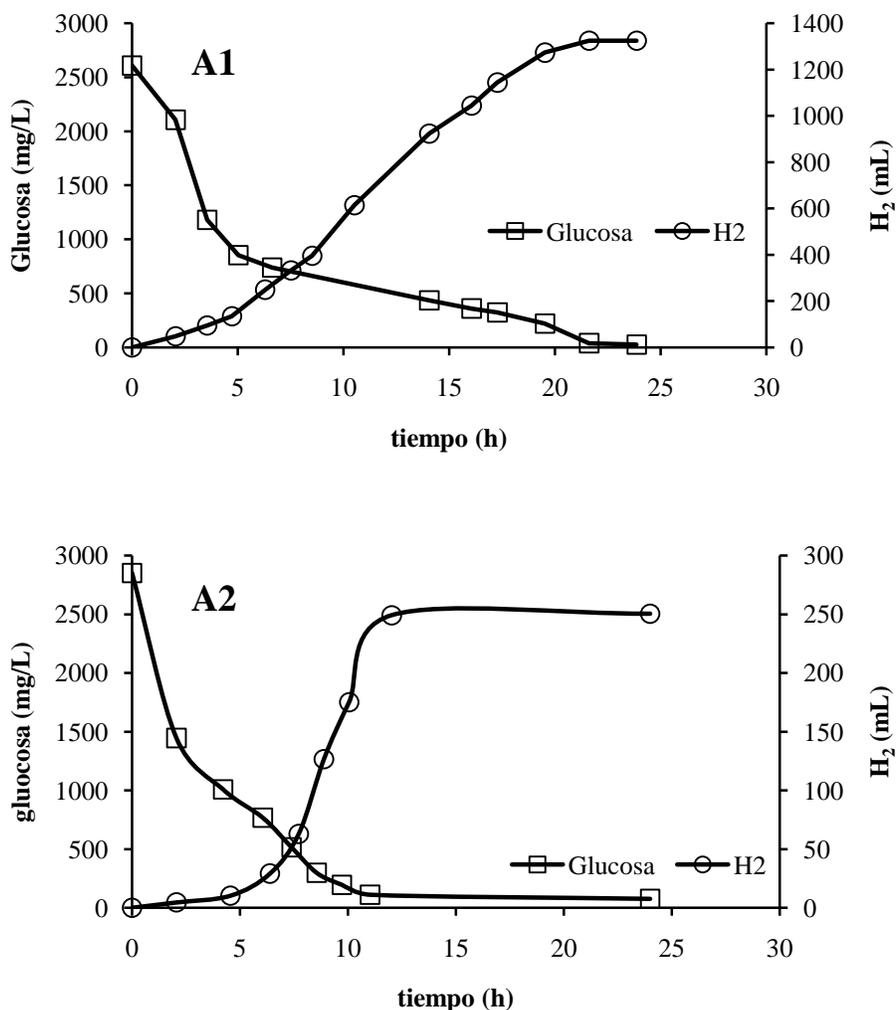


Figura 3.8. Producción de H₂ en función del consumo de glucosa en el reactor A1 y A2

La figura 3.8 muestra la producción de H₂ en función del consumo de glucosa; se alcanza prácticamente un 100% del consumo de glucosa en ambos experimentos, durante las primeras 8h después de la alimentación. Para ambos experimentos hay una caída pronunciada de la concentración de glucosa debido a que en estas horas es cuando ocurre la producción exponencial de hidrógeno, por lo tanto una alta tasa de consumo de glucosa.

3.6 pH

El pH no estuvo controlado durante los ciclos, únicamente ajustado al inicio de cada uno a 6.5 en ambos experimentos. La figura 3.9 muestra el comportamiento en cada uno de los experimentos, el pH final en todos los ciclos estuvo alrededor de 4.7, similar a lo reportado por Karapinar & Kargi, (2006).

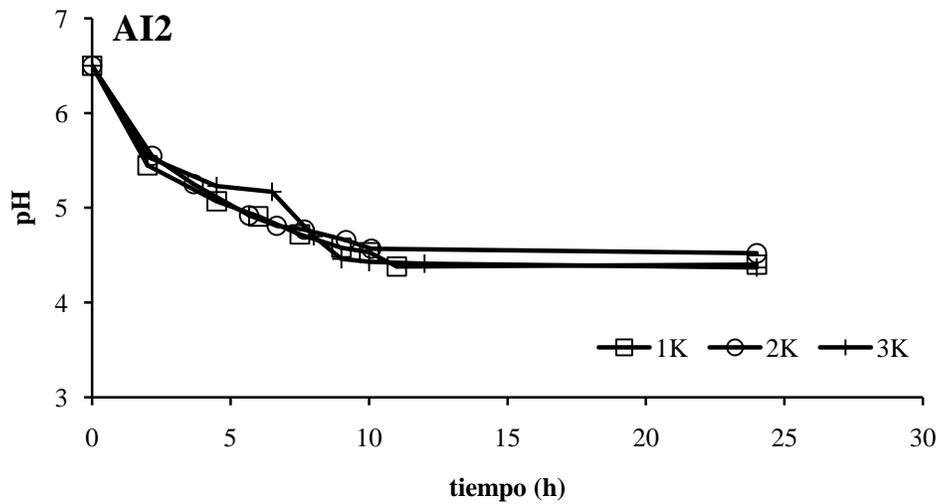
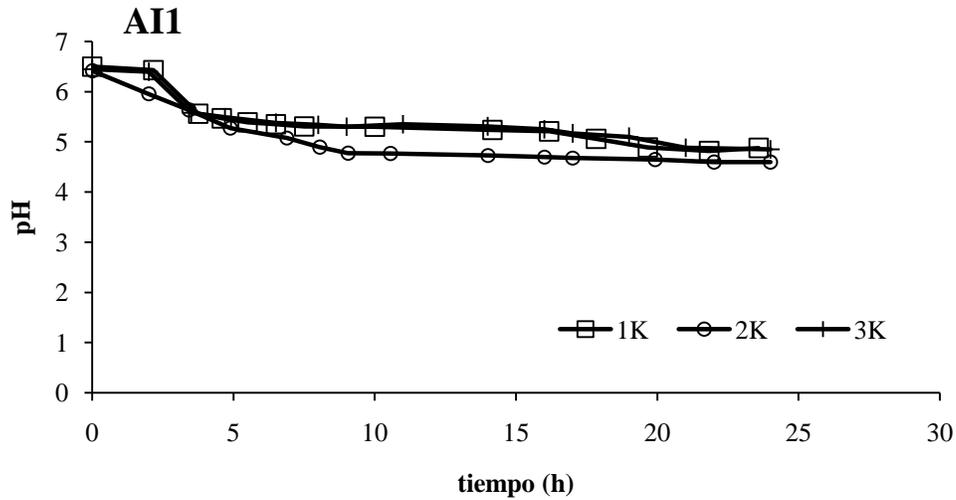


Figura 3.9. Comportamiento del pH durante un ciclo de operación en el experimento A1 y A2

3.7 Evaluación de la producción de Hidrógeno en el reactor empacado con medio de soporte de cerámico

Al igual que el reactor A, el inóculo del reactor B fue activado y aclimatado con glucosa. Cuando se obtuvo una producción y composición constante del biogás se consideró una aclimatación completa. La figura 3.10 muestra el comportamiento del reactor en cuanto a la producción de biogás en función del tiempo.

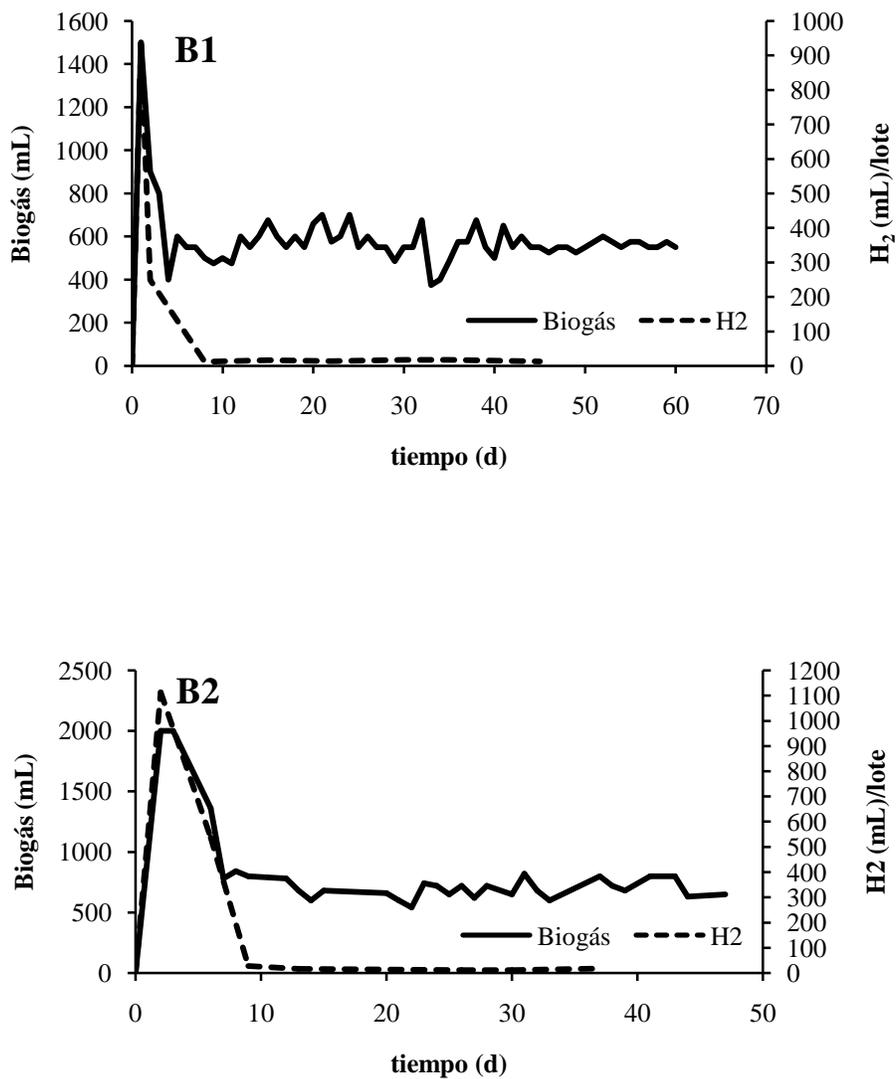


Figura 3.10. Producción de biogás e hidrógeno en función del tiempo de operación durante el experimento B1 y B2.

3.8 Contenido de H₂

Los resultados en los experimentos B1 y B2 fueron similares. Se logró una aclimatación de la biomasa después del día 20 aproximadamente. El volumen de biogás producido durante los experimentos B1 y B2 fue de 568 ± 64 mL y 690 ± 76 mL respectivamente. El biogás estuvo compuesto únicamente por H₂ y CO₂, en ninguna de las muestras analizadas se detectó metano. El porcentaje de H₂ en el biogás fue de 3.6% y 2.8% respectivamente.

La figura 3.11 es la representación del estudio de un ciclo de operación del reactor B1 y B2, la mayor velocidad específica de producción de hidrógeno se encontró entre las 2 y las 10 horas de operación y fue, para el experimento B1 de $0.8 \text{ mL H}_2 \text{ h}^{-1} \text{ gSSV}^{-1}$ y $0.6 \text{ mL H}_2 \text{ h}^{-1} \text{ gSSV}^{-1}$ para el experimento B2. Ambos experimentos mostraron mayor estabilidad durante su operación que los experimentos del reactor A, sin embargo se obtuvo un menor volumen de biogás y un bajo contenido de hidrógeno, lo cual se relaciona con la ruta metabólica seguida, que fue la de producción de ácido propiónico (ec. 15), cuya reacción indica el consumo de hidrógeno de la siguiente manera (Argun *et al.*, 2008):

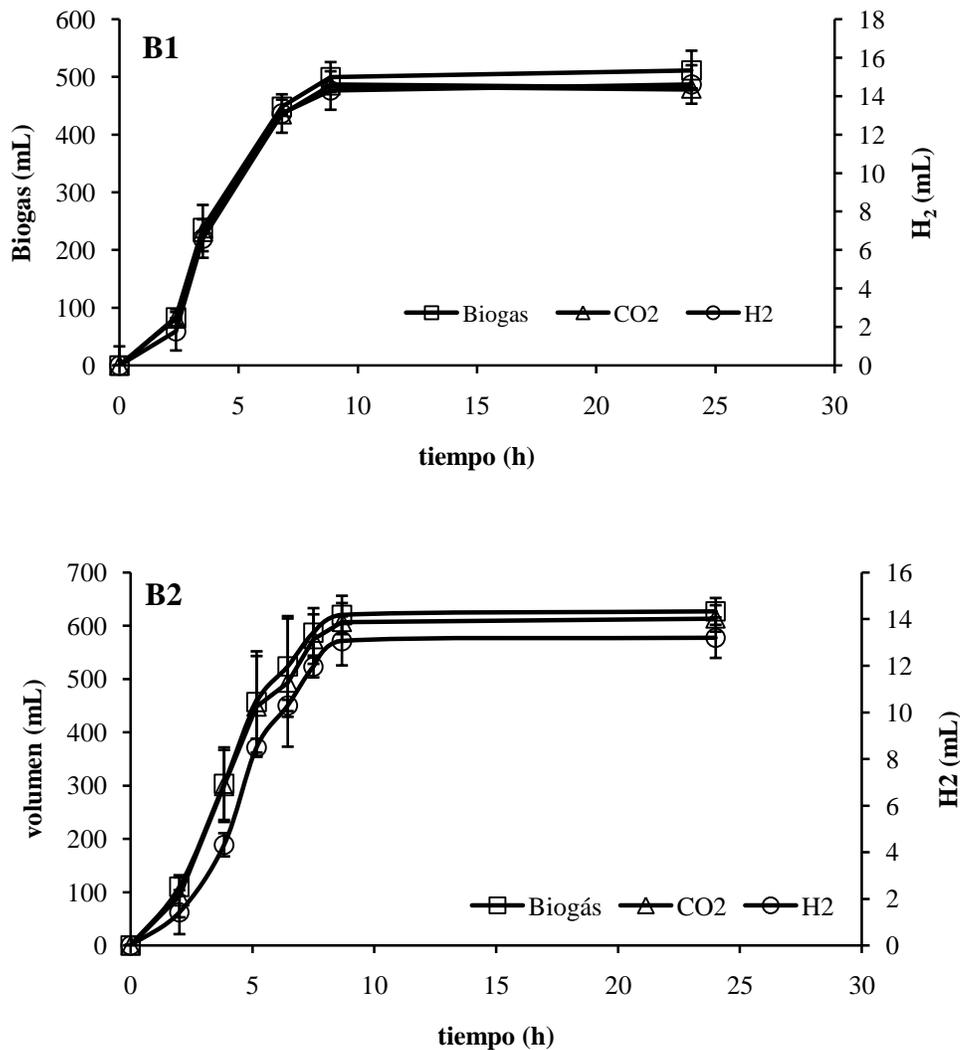


Figura 3.11. Cinética del reactor B. Experimento B1 y B2 durante la producción de H₂

La figura 3.12 muestra el ajuste de los datos experimentales para cada experimento en el reactor B usando la ecuación modificada de Gompertz.

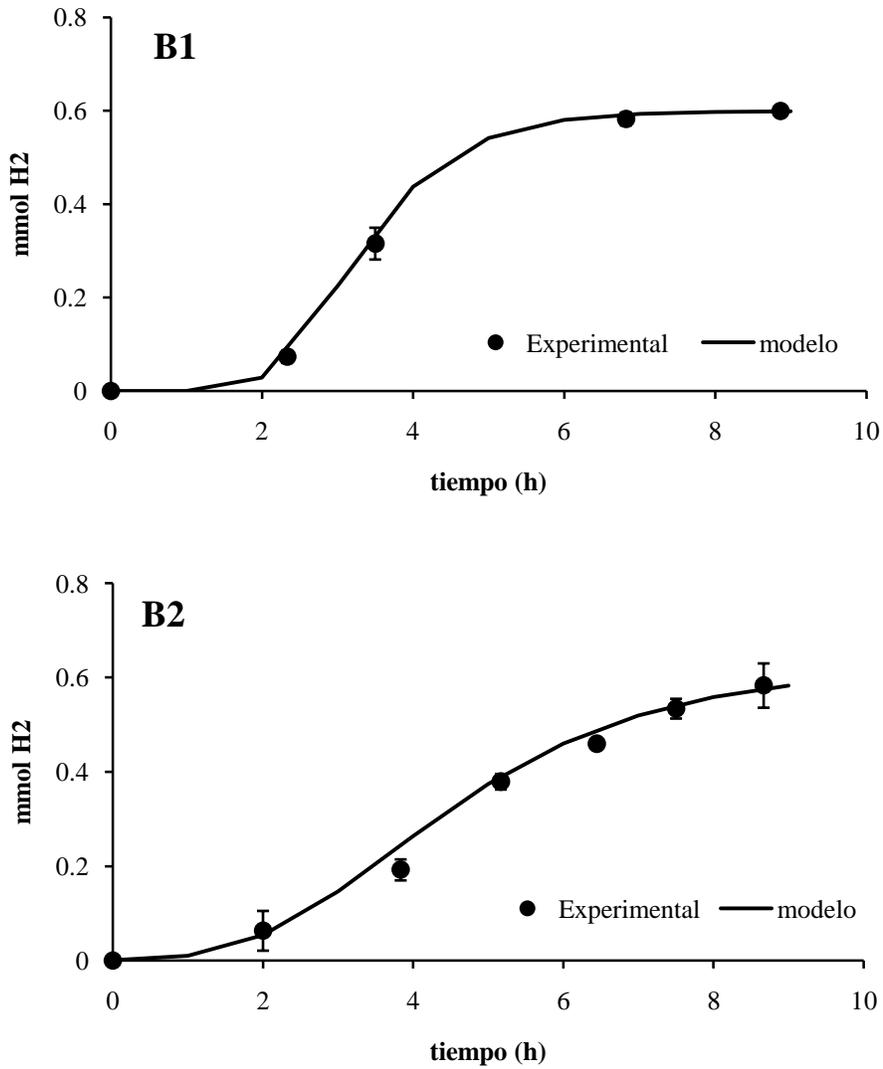


Figura 3.12. Ajuste de los datos experimentales del reactor B por la ecuación de Gompertz

La tabla 3.3 resume los parámetros de ajuste de la ecuación de Gompertz

Tabla 3.3. Parametros de ajuste de la ecuación de Gompertz para el reactor B

| | H_{\max} | R_{\max} | λ |
|-----------|------------------|------------------|-----------------|
| Condición | mmol H_2 | mmol H_2 /h | h |
| B1 | 0.6 ± 0.005 | 0.25 ± 0.08 | 2.1 ± 0.057 |
| B2 | 0.62 ± 0.015 | 0.12 ± 0.015 | 1.8 ± 0.152 |

La tabla 3.3 muestra que para ambos experimentos, B1 y B2 se obtiene una producción molar semejante, no así en cuanto a las velocidades de producción de H_2 donde la del experimento B1 duplica la del B2 esto atribuido a las diferencias entre el inóculo 1 y 2, y todas estas menores a las de los experimentos realizados en el reactor A, esto debido a que en el reactor B la ruta metabólica siempre estuvo dirigida hacia la producción de ácido propiónico cuya producción implica el consumo de hidrógeno.

Las velocidades máximas de producción para el B1 y B2 fue de 5.6 y 2.69 mL H_2 /h respectivamente. Para determinar el tiempo al cual ocurre esta velocidad máxima de producción de H_2 se calcula la derivada de la ecuación de Gompertz y entonces se obtiene lo siguiente (Figura 3.13)

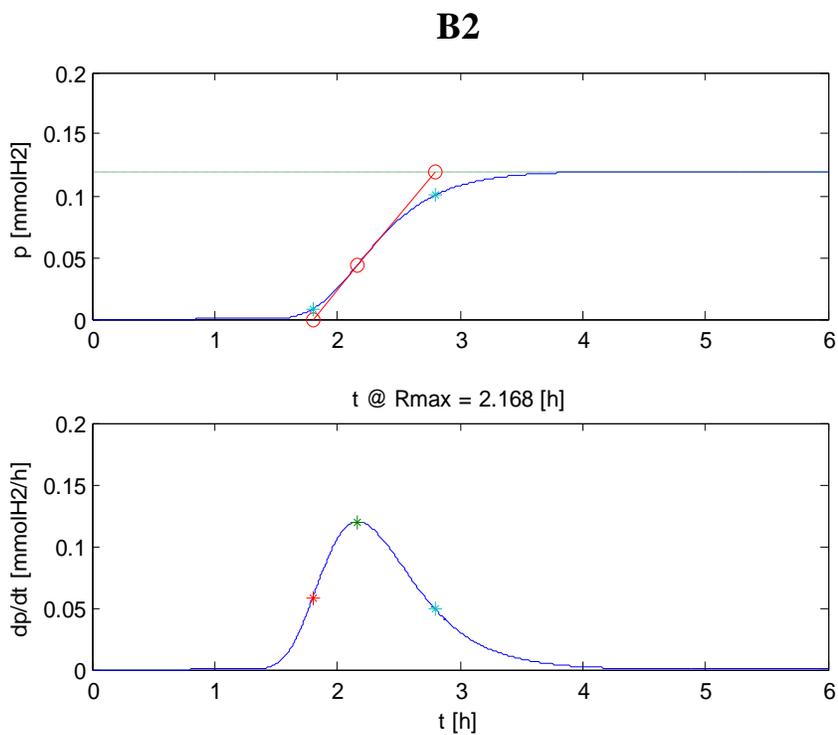
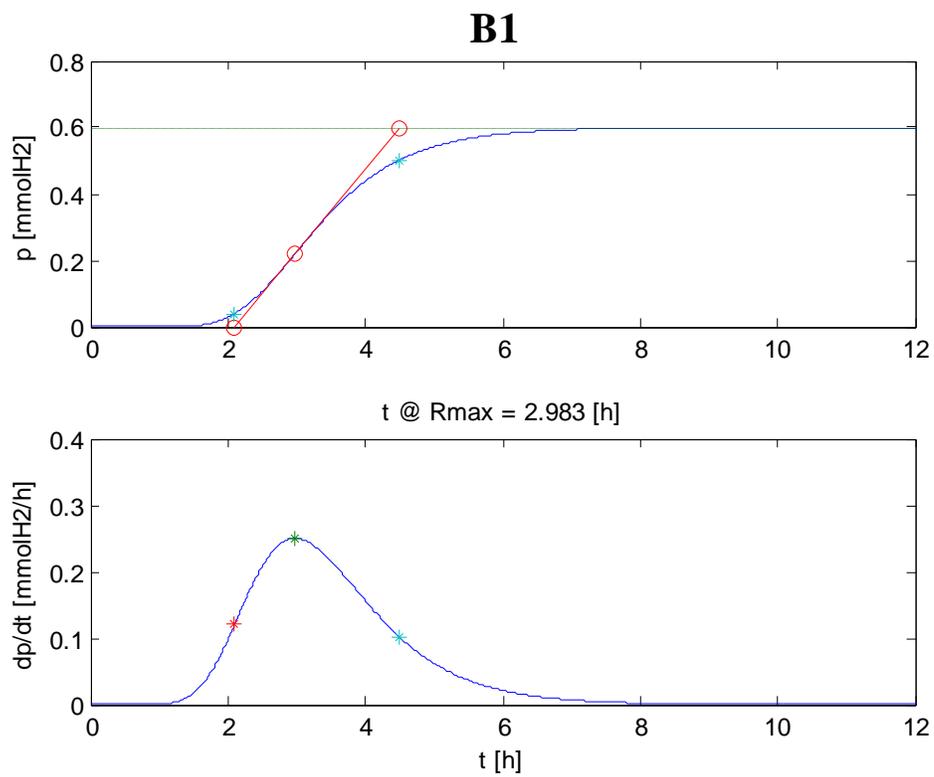


Figura 3.13. Tiempo al cual ocurre la máxima velocidad de producción de hidrógeno durante los experimentos B1 y B2

El tiempo al cual ocurre la velocidad máxima de producción de H₂ para el experimento 1 en el reactor B, B1 fue de 2.9 h y para el experimento 2, B2, de 2.1, aun cuando las velocidades máximas de producción de H₂ son diferentes el tiempo al cual ocurren es muy cercano en ambos experimentos

3.9 Ácidos grasos volátiles

En la figura 3.14 se observa en el experimento B1 que el ácido acético, relacionado con la producción de hidrógeno, fue uno de los mayores subproductos. Sin embargo, se obtuvo un bajo rendimiento del hidrógeno que puede ser explicado por la presencia de bacterias homoacetogénicas, principalmente clostridia homoacetogénica, que crece heterotróficamente convirtiendo azúcares simples en acetato sin generar hidrógeno. (Chen *et al.*, 2009) además de presentar una mayor producción de ácido propiónico.

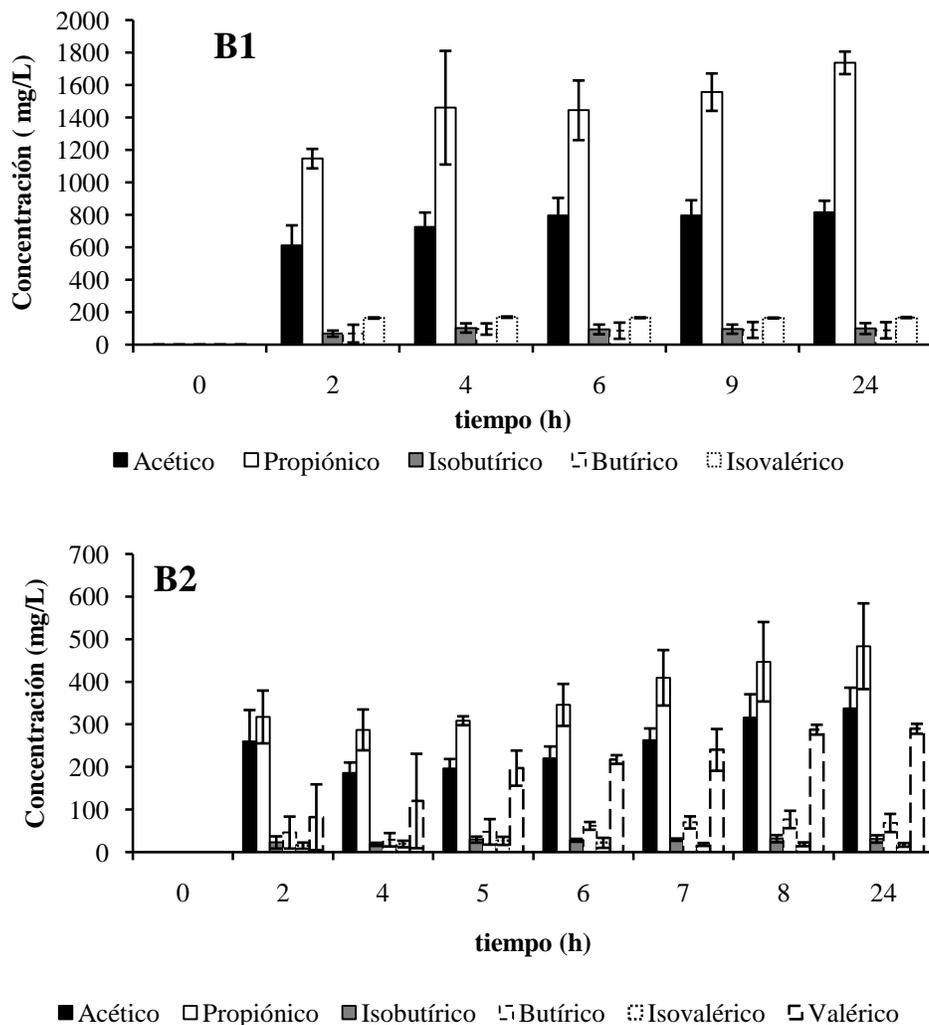


Figura 3.14. Productos finales de la fermentación durante la producción de H₂ en el experimento B1 y B2.

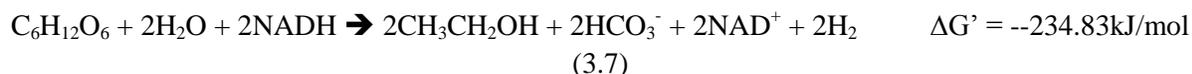
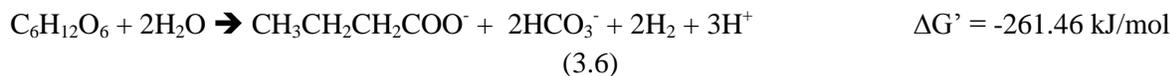
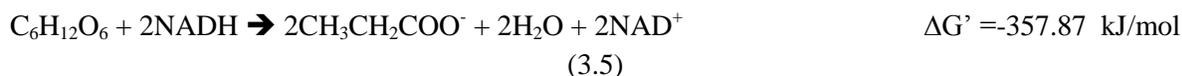
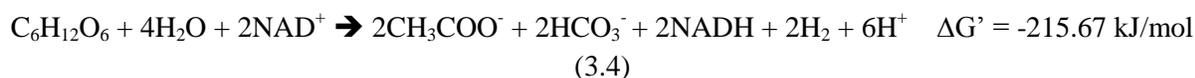
De acuerdo con la figura 3.14 se sugiere que en el periodo del experimento B2 se desarrollaron microorganismos diferentes a los del experimento 1, los cuales llevaron a la producción de ácido valérico el cuál no esta en la ruta metabólica de producción de hidrógeno y esto provocó un menor porcentaje de H₂.

La tabla 3.4 resume las concentraciones de los ácidos grasos producidos durante la producción anaerobia de H₂ en el reactor B

Tabla 3.4. Productos principales al final de la fermentación durante la producción de hidrógeno durante los experimentos B1 y B2

| Compuesto | Concentración (mg/L) | |
|---------------|----------------------|-----------|
| | B1 | B2 |
| Ácidos | | |
| Acético | 815 ± 71 | 337 ± 48 |
| Propiónico | 1736 ± 69 | 483 ± 100 |
| Isobutírico | 99 ± 33 | 31 ± 8 |
| Butírico | 88 ± 49 | 68 ± 21 |
| Isovalérico | 167 ± 3 | 17 ± 4 |
| Valérico | -- | 289 ± 11 |
| Total | 2905 | 1225 |

Las reacciones 3.4 a la 3.7 muestran que el hidrógeno es generado cuando la ruta metabólica es hacia la producción de ácido acético, ácido butírico o etanol. No así cuando se sigue la ruta metabólica de la producción de ácido propiónico (Jianzheng *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2005)



Se ha visto que cuando una biopelícula se hace gruesa sobre un empaque no poroso, los microorganismos desarrollan una estructura acanalada a fin de que el fluido pase a través de ella proveyendo de esta forma de sustrato y removiendo aquellos productos que de otra manera habrían tenido que removerse únicamente por difusión celular, un proceso mucho más lento (Wimpenny *et al.*, 2000). Esto no podría ocurrir en un material poroso donde hay microorganismos hacia el interior del

empaques que quedan desprovistas de sustrato debido a las capas más externas de la biopelícula que cubren la superficie del empaque, así que recibirán sustrato cuando éstas sean removidas por el flujo circundante o por el proceso natural de desprendimiento. Con base en esto habrá dentro del empaque periodos de ayuno y esto puede llevar a la selección de bacterias no formadoras de esporas, productoras de ácido propiónico como la *selenomonas* sp. (Hawkes *et al.*, 2007).

Cuando se usa un medio de soporte poroso, como en este caso, las burbujas de biogás pueden penetrar el medio de soporte lo que hará que exista un menor contacto entre la biopelícula y el sustrato lo que como consecuencia dará una menor producción de hidrógeno.

Otro factor que puede conducir a una baja producción de hidrógeno cuando se tiene un empaque poroso con biopelícula gruesa, es la acumulación de ácido propiónico debida a una diferencia entre el valor de pH hacia el interior de los poros del empaque, donde existe una cantidad considerable de microorganismos, y el pH del medio, esto debido a la limitación de la transferencia de masa y al incremento en la presión parcial del hidrógeno dentro del empaque. (Kim *et al.*, 2005).

Estudios realizados por (Kim *et al.*, 2005) muestran que la acumulación de ácido propiónico y otros ácidos grasos causan inhibición severa de los microorganismos productores de hidrógeno y que su actividad no puede ser recuperada incluso una vez que la acumulación ha disminuido.

3.10 Consumo de glucosa

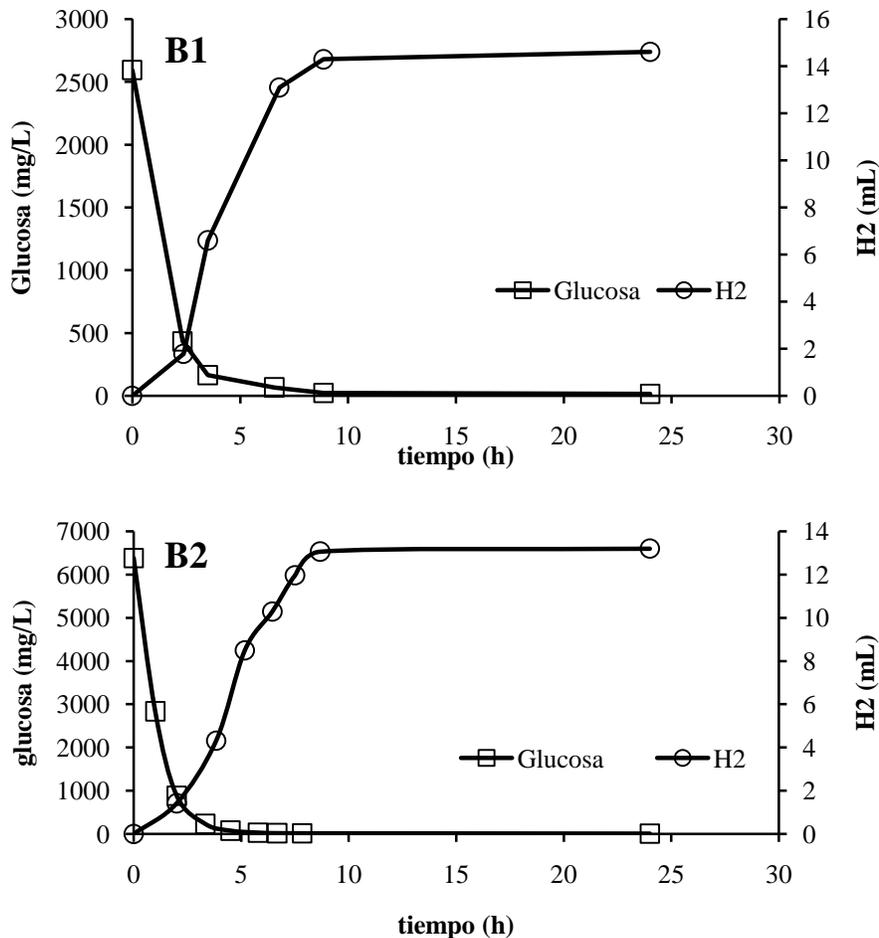


Figura 3.15. Producción de H₂ en función del consumo de glucosa en el reactor B1 y B2

La figura 3.15 muestra la producción de H_2 en función del consumo de glucosa, donde se alcanza prácticamente un 100% del consumo de glucosa en ambos experimentos, B1 y B2. La biomasa consume la glucosa en 5 horas después de que era alimentada, mismas que corresponden al periodo de producción exponencial de H_2 .

3.11 pH

Al igual que en el reactor A el pH no fue controlado durante el ciclo, solo se ajusto al inicio de cada uno a un valor de 6.5 y la figura 3.16 muestra que su valor final después de cada ciclo estuvo alrededor de 4.5 para ambos experimentos.

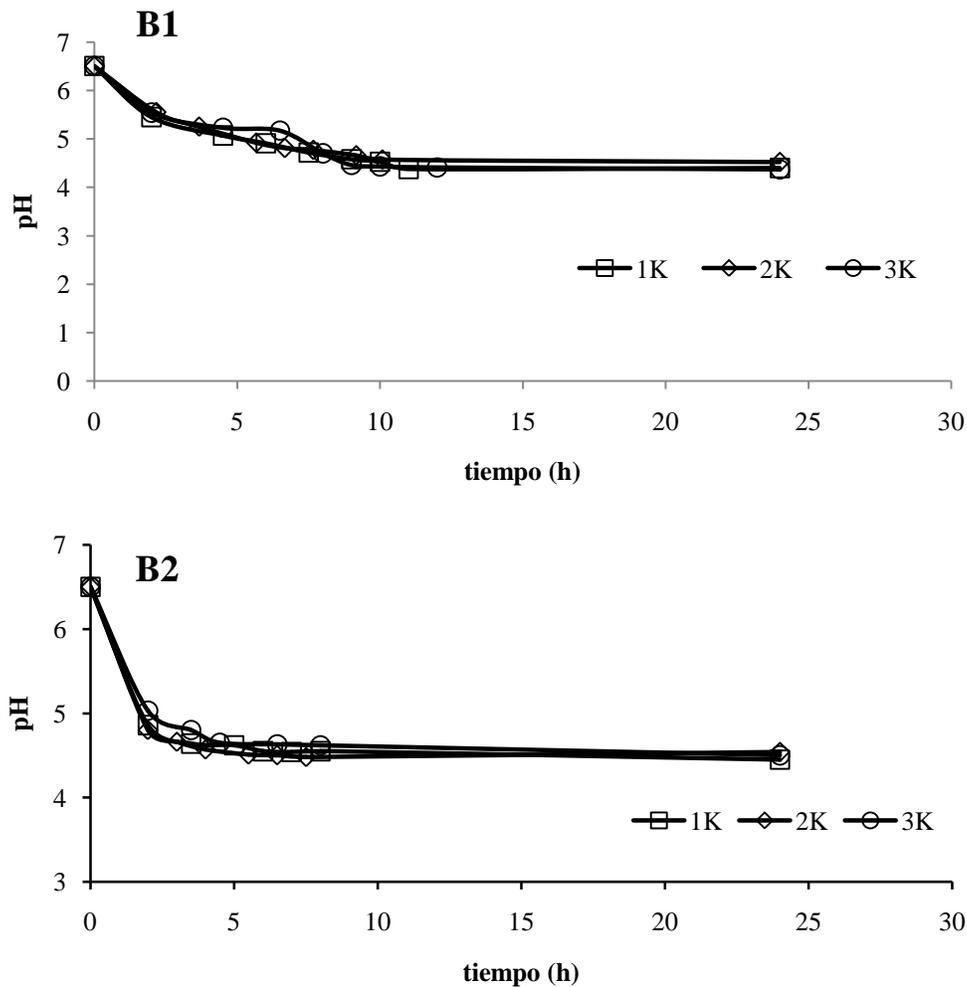


Figura 3.16. Comportamiento del pH durante un ciclo de operación del experimento B1 y B2.

3.12 Caracterización de los lodos

| Característica | Lodo Toluca | Lodo Guadalajara |
|---|-------------|------------------|
| Actividad metanogénica, (gDQO- CH ₄ / g SSV-d) | 0.43 | 0.44 |
| Masa de 0.6 mm, % | 41 | 86 |
| Masa de 0.4 mm, % | 20 | 7 |
| Masa de flóclulo, % | 39 | 7 |
| % de recuperación | 85 | 94 |

El resultado de la caracterización de lodos muestra que el lodo de Guadalajara es un lodo de flóculos mas grandes y mejor formados que los del lodo de Toluca, el cual se considera un lodo floculento, lo cual sugiere que el reactor de Guadalajara opera bajo condiciones muy bien controladas lo que hace que su lodo sea estable, esto también se muestra en el análisis de la actividad metanogénica, que aun después de estar almacenado durante aproximadamente un año presenta una actividad prácticamente igual al lodo de Toluca recién muestreado. Todo esto se ve reflejado en los resultados en los experimentos donde se trabaja con el inóculo 2, presentando bajos rendimientos en cuanto a la producción de H₂.

3.13 Balance de electrones

La tabla 3.5 presenta el balance de DQO para los experimentos A1 y B1.

Tabla 3.5. Balance de electrones para el experimento 1

| Experimento | Entrada | | | Salida | | | Porcentaje de cierre |
|-------------|-----------|------|---------|----------------|--------|---------|----------------------|
| | Compuesto | (g) | (g DQO) | Compuesto | (g) | (g DQO) | |
| A1 | Glucosa | 13.5 | 14.4 | Ac.Acético | 4.35 | 4.65 | 93% |
| | | | | Ac.Propiónico | 1.624 | 2.457 | |
| | | | | Ac.Isobutírico | 0.9024 | 1.64 | |
| | | | | Ac.Butírico | 1.319 | 2.397 | |
| | | | | Ac.Isovalérico | 0.6180 | 1.29 | |
| | | | | Hidrógeno | | 0.996 | |
| B1 | Glucosa | 13.6 | 14.511 | Ac.Acético | 3.03 | 3.24 | 106 % |
| | | | | Ac.Propiónico | 6.63 | 10.04 | |
| | | | | Ac.Isobutírico | 0.316 | 0.574 | |
| | | | | Ac.Butírico | 0.1530 | 0.278 | |
| | | | | Ac.Isovalérico | 0.6608 | 1.347 | |
| | | | | Hidrógeno | | 0.008 | |

El balance de electrones con un buen cierre indica que los resultados obtenidos son confiables. Es decir, se tuvo un buen control en la cuantificación del biogás así como de los subproductos.

3.14 Comparación de los dos sistemas

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos en los experimentos A1 y B1.

Tabla 3.6. Tabla de resultados de los experimentos A y B

| Experimento | Biogás | H ₂ | | | | AGV | | |
|-------------|--------|----------------|------|-------------------|---|---------|------------|----------|
| | mL | % | mL | mol / mol glucosa | R _{max} (mmol H ₂ h ⁻¹) | mg/L | | |
| | | | | | | Acético | Propiónico | Butírico |
| A1 | 2683 | 49.3 | 1324 | 0.83 | 4.1 | 1369 | 416 | 663 |
| A2 | 1240 | 20.1 | 250 | 0.14 | 2.1 | 241 | 373 | 138 |
| B1 | 511 | 3 | 14.6 | .008 | 0.25 | 815 | 1736 | 88 |
| B2 | 626 | 2 | 13 | .007 | 0.12 | 337 | 483 | 68 |

La diferencia entre los resultados de los experimentos del reactor A y B se debió a que en los experimentos del reactor B la ruta metabólica seguida fue la de producción de ácido propiónico que como ya se discutió anteriormente, involucra el consumo de hidrógeno. Por otro lado el uso de un tipo de inóculo diferente tuvo un efecto negativo sobre la producción de hidrógeno en el reactor A2 al producir la mitad de lo producido en A1 mientras que este efecto se vió reflejado únicamente en la velocidad máxima de producción de hidrógeno en el reactor B. Los resultados del reactor A1 coinciden con los reportados en literatura donde los rendimientos varían entre 1 y 2 mol/mol de glucosa y teniendo como principales subproductos los ácido acético y butírico (Lo *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2006, Baisaillon *et al.*, 2006).

Un análisis estadístico mediante la prueba t, muestra que la probabilidad asociada con el valor t entre los experimentos A1 y A2 es de 0.001 lo que quiere decir que existe una diferencia significativa entre ambos valores, de igual manera entre los experimentos A1 y B1 y entre A2 y B2 donde la probabilidad asociada con el valor t fue de 0.001 para ambos, no así entre los experimentos B1 y B2 donde no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos, donde se obtuvo una probabilidad asociado al valor t de 0.189.

3.14 Efecto de la alcalinidad sobre la producción de hidrógeno

Debido a los resultados obtenidos con el inóculo 2, se decidió emplear este inóculo en pruebas de producción de H₂ donde el pH estuvo amortiguado con una solución de CaCO₃ a fin de determinar si esto podía de alguna forma mejorar el desempeño de dicho inóculo.

3.14.1 Producción de H₂ sin control de pH

La figura 3.17 presenta el comportamiento del reactor (véase punto 2.7) sin CaCO₃; durante el primer ciclo se produce la mayor cantidad de biogás y después la producción de biogás empieza a disminuir hasta cero (1). Este comportamiento se asocia con una caída en el pH (3.88) (figura 3.18) debida a la alta producción de AGV, la cual se sabe puede inhibir la producción de biogás (Won & Lau, 2011). Debido a este comportamiento, se hizo un centrifugado de todo el medio y se reemplazó con medio nuevo, esto provocó un comportamiento similar al del primer ciclo, se produce un pico de biogás, (lo que puede comprobar que en el medio existe la cantidad suficiente de AGV capaz de inhibir la producción de biogás) e inmediatamente después la producción cae hasta menos de la mitad (75 mL)

y se mantiene estable (2). Sin embargo, la cantidad producida de biogás, aunque estable, fue muy baja considerando la producción teórica de acuerdo a la cantidad de sustrato alimentado. Por esta razón, se aumentó la cantidad de sustrato alimentado (de 1 g/L en la etapa inicial a 2 g/L) y como se esperaba, aumentó la producción de biogás (3) sin embargo la cantidad producida seguía siendo baja y después de 8 ciclos de operación la producción empezó a caer (4). En este punto se volvió a centrifugar el medio, sin embargo, a partir de este punto la producción de biogás no se recuperó

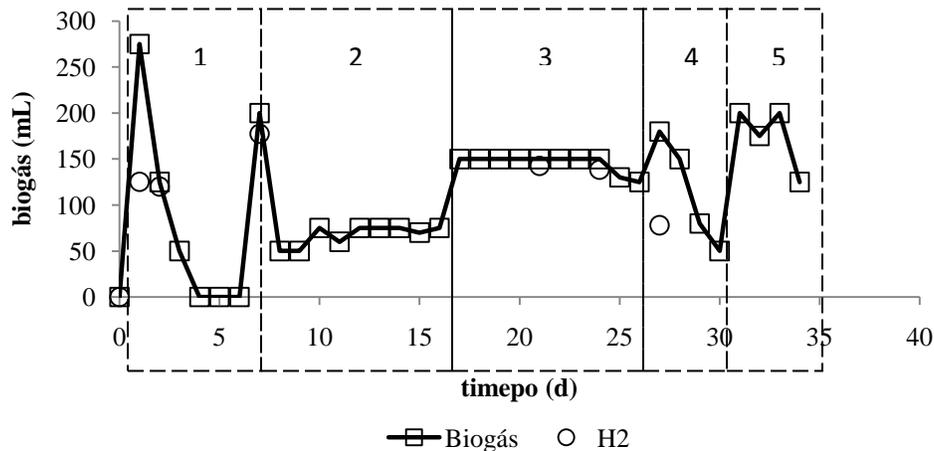


Figura 3.17. Producción de biogás e H₂ sin alcalinidad. Etapa 1 el arranque, 2 centrifugado uno, 3 aumento de la concentración de sustrato, 4 centrifugado 2

Cada caída en la producción de biogás estuvo relacionada con una caída en el pH relacionado a su vez con una alta concentración de AGV, de ahí que resulta congruente que cada vez que el medio se centrifuga hay un pico de producción de biogás.

3.14.2 pH

Al iniciar el experimento el pH se ajustó a 7 al inicio de cada ciclo. Estudios recientes de experimentos en discontinuo reportaron que el pH inicial óptimo para la producción de H₂ puede variar de acuerdo al tipo de sustrato usado. Así para Xilosa se tiene 6.5 (Lin & Cheng, 2006), pH de 5.5 a 5.7 para sacarosa (Wang *et al.*, 2005), 6 para almidón y suero de queso (Ferchichi *et al.*, 2005); al iniciar cada ciclo en 7 se esperaba que a medida que transcurriera la reacción el pH fuera disminuyendo, debido a la producción de ácidos grasos, hasta alcanzar el óptimo (Kawagoshi *et al.* 2005). Sin embargo, el pH cayó a valores inferiores del óptimo y la producción de H₂ cesó, con esto se decidió emplear una solución buffer de citratos para mantener el pH en el rango óptimo, así, se arrancaba el reactor a pH de 5.5. Sin embargo, aparentemente la producción de AGV alcanzó niveles inhibitorios de la producción de hidrógeno lo cual simultáneamente disminuyó la capacidad amortiguadora del buffer utilizado. Figura 3.18.

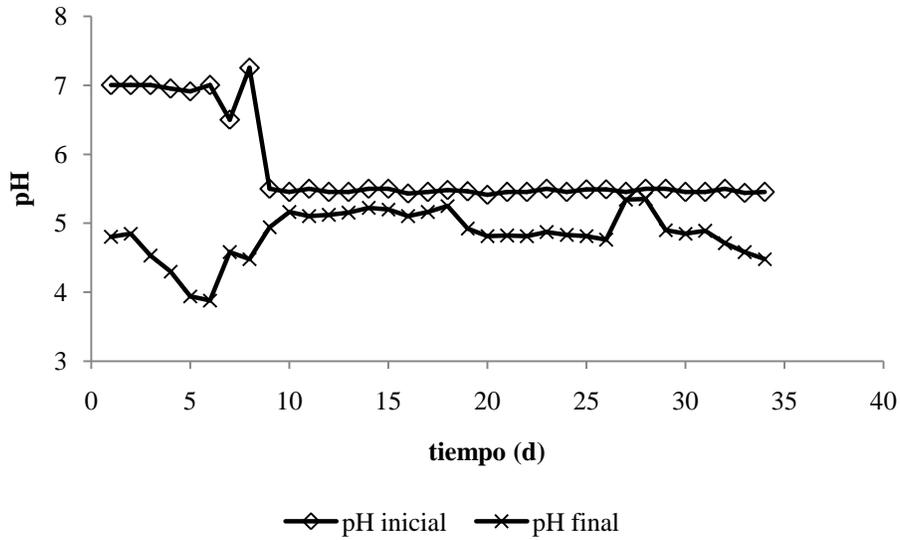


Figura 3.18. Comportamiento del pH durante la producción de H₂ sin control del pH

3.15 Producción de H₂ controlando el pH con 1 y 2 g/L CaCO₃

Por los resultados obtenidos se decidió realizar nuevos experimentos, teniendo como objetivo, evaluar el efecto de la alcalinidad sobre la producción de hidrógeno, usando la alcalinidad del medio como una forma de amortiguar el pH. La figura 3.20 muestra el comportamiento para el reactor donde se usó 2 g/L de CaCO₃. El reactor donde se usó 1 g/L, figura 3.19 tuvo un rápido decaimiento en la producción de biogás por lo que solo se siguió con la operación del reactor de 2 g/L de CaCO₃.

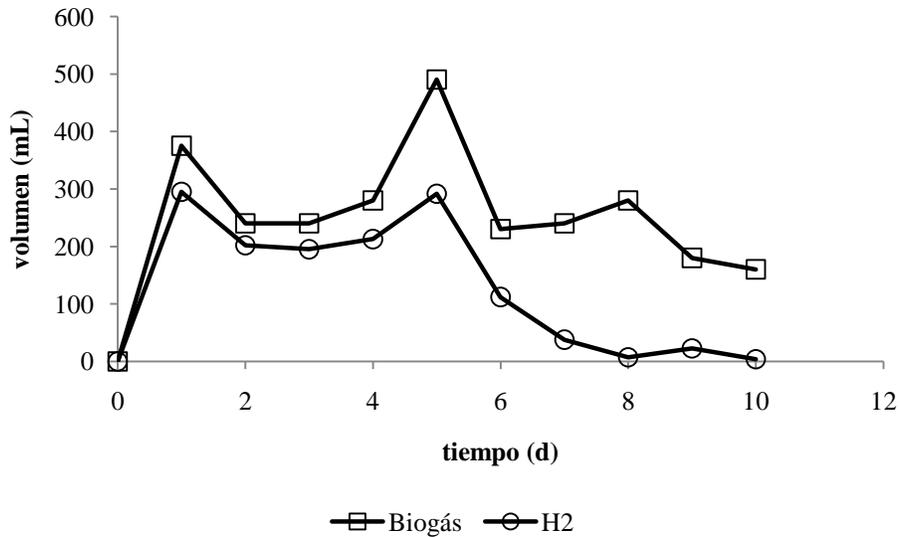


Figura 3.19. Producción de H₂, pH controlado con 1 g/L CaCO₃

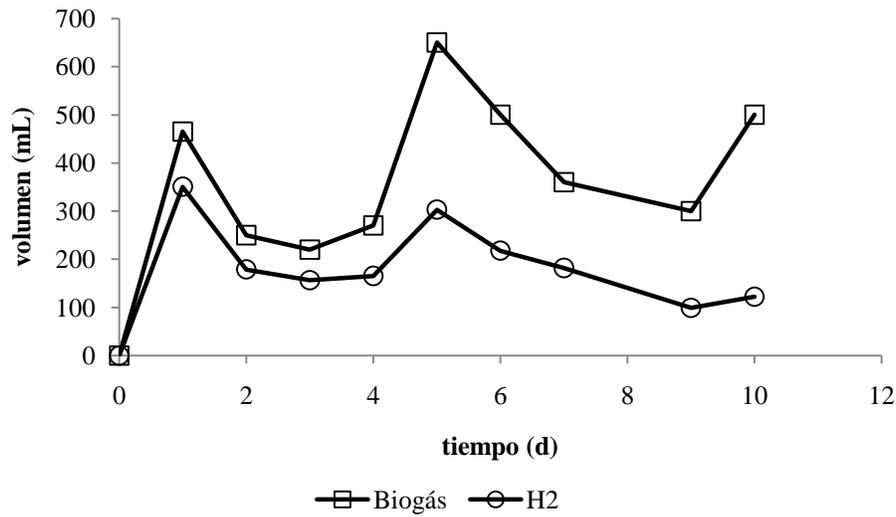


Figura 3.20. Producción de H₂, pH controlado con 2 g/L CaCO₃

3.15.1 Ácidos grasos volátiles

En la figura 3.19 se observa el desempeño del reactor, una concentración de 2 g/L de CaCO₃ ayudó a mantener la producción de H₂ estable pero baja. Como se observa en la figura 3.21 a medida que la concentración de ácido propiónico fue aumentando la producción de H₂ fue en decaimiento y como consecuencia el pH llegó a valores inferiores a 5 los cuales se sabe (Mu *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2005) (Figura 3.22), no son óptimos para la producción de H₂.

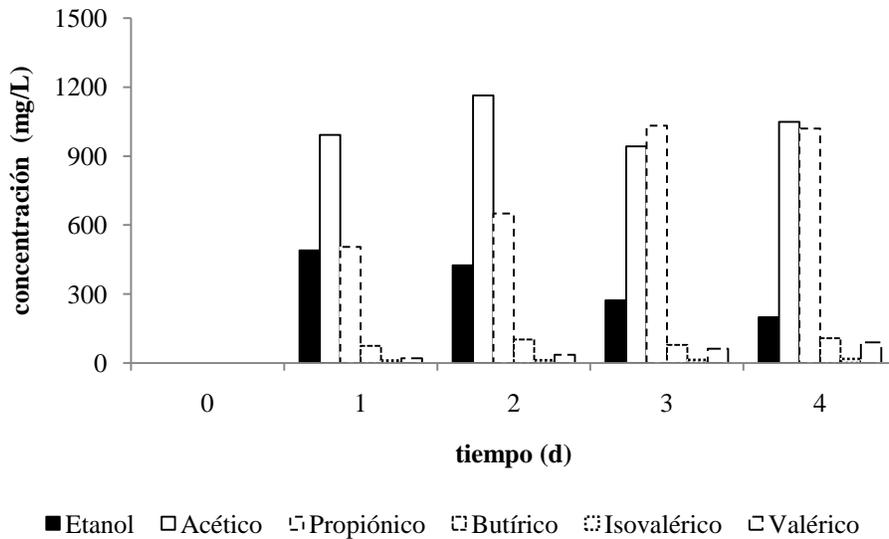


Figura 3.21. Productos finales de la fermentación cuando el pH es controlado con 2 g/L de CaCO₃

Es interesante que en esta prueba se haya producido más ácido propiónico que lo que se esperaría de acuerdo al proceso (butírico y acético), lo cual sugiere la presencia de no únicamente *C. Butyricum* sino también de otras especies de clostridia productoras de ácido propiónico como *C.arcticum*, *C.novyi*, y *C.propionicum*. (Khanal *et al.*, 2004).

3.15.2 pH

La producción de ácidos grasos, específicamente de acético y propiónico, fue lo suficientemente alta como para abatir la capacidad bufer del medio conduciendo a un desequilibrio en el pH llevándolo hasta valores inferiores a 5 los cuales se saben (Mu *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2005) no son los indicados para la producción de H₂.

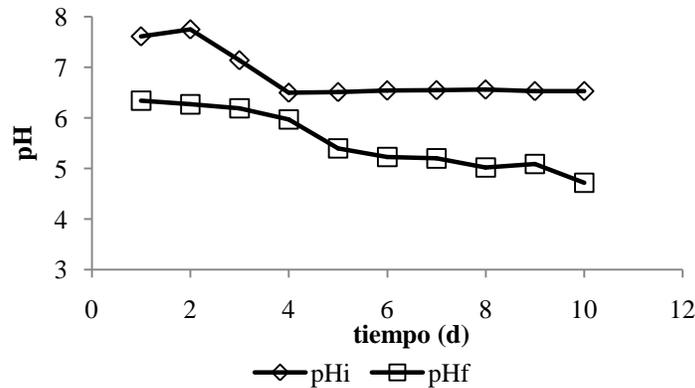


Figura 3.22. Comportamiento del pH durante la producción de H₂ cuando el pH es controlado con 2 g/L CaCO₃

3.16 Producción de H₂ controlando el pH con 2 g/L CaCO₃

De acuerdo a los resultados anteriores 2 g/L de CaCO₃ podrían ayudar a tener un mejor desempeño en cuanto a la producción de H₂ ayudando a neutralizar la acidez causada por la producción de AGV por esto se hizo una réplica del estudio usando 2g CaCO₃. La figura 3.23 muestra los resultados de dicho experimento.

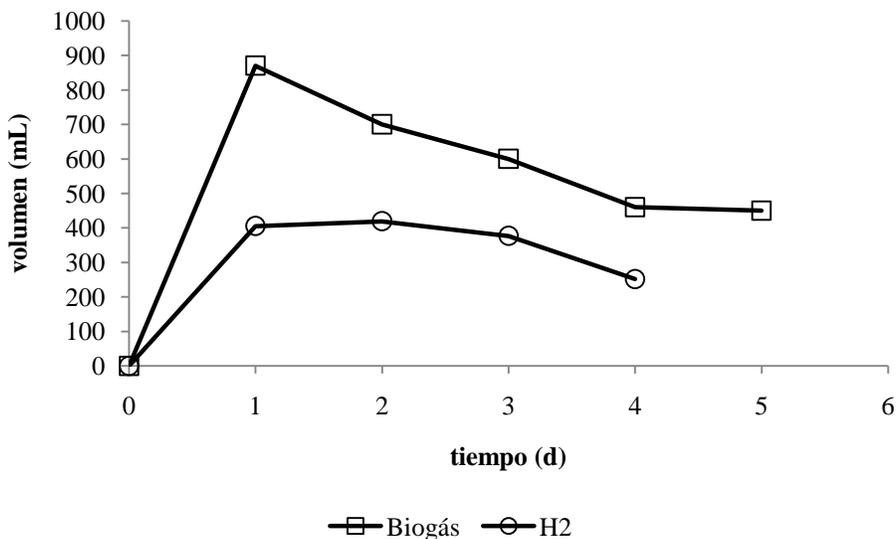


Figura 3.23. Producción de H₂ cuando se usa 2g/L de CaCO₃ para controlar el pH

El reactor se mantuvo en una producción de biogás de alrededor de 500 mL, sin embargo con una composición de H₂ tendiendo a disminuir con cada ciclo.

3.16.1 Ácidos grasos volátiles

Si se observa el comportamiento de la producción de ácido acético en la figura 3.24, se notará que este es simultáneo a la producción de H₂ de la figura 3.23, ya que este se relaciona con la producción de H₂. En esta misma gráfica se observa que a medida que pasan los ciclos y que el acetato disminuye la producción de ácido propiónico va en aumento acelerando el decaimiento de la producción de H₂. El reactor muestra una producción de ácido acético estable aunque también se observa que el ácido propiónico tiende a aumentar después del ciclo 4.

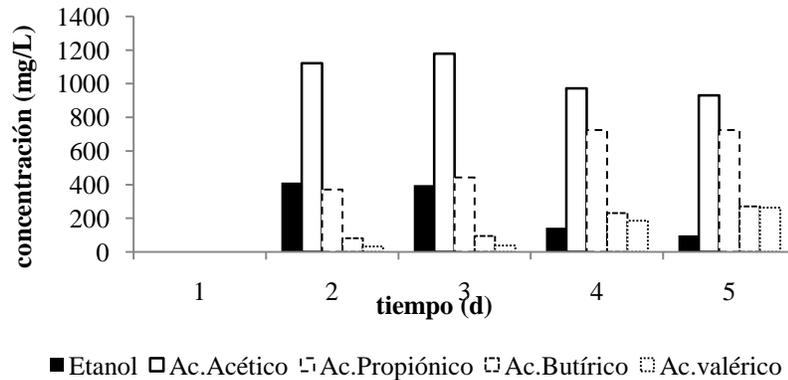


Figura 3.24. Productos finales de la fermentación cuando se usa 2g/L CaCO₃

Es importante notar que se presenta la producción de etanol. Sobre esto existen varios puntos de vista en la literatura acerca de la producción de etanol durante la fermentación para la producción de H₂. De acuerdo con Skonieczny y Yargeau (2009), la presencia de etanol durante la fermentación por *Clostridia* es indeseable debido a su efecto tóxico en esta bacteria. Sreethawong *et al.*, (2010), reportó que la fermentación etanólica puede consumir electrones libres que son requeridos para formar hidrógeno y conduce por lo tanto a un mayor contenido de CO₂ en el biogás. Por otro lado, la fermentación de solventes durante se sabe asociada con los primeros pasos de esporulación de las *Clostridia* (Won & Lau, 2011). Ren *et al.*, (2006) encontró que el rendimiento de H₂ se ve afectado por la presencia de etanol y acetato en fase líquida, y que la máxima velocidad de producción de H₂ ocurrió cuando la relación EtOH: HAc fue cercano a 1 en un estudio a escala piloto usando un CSTR y melaza como sustrato. Ellos reportaron que el pH 4.5 es adecuado para la producción de H₂ por medio de una fermentación etanólica ya que la relación NADH/NAD⁺ es inestable vía fermentación de ácido butírico, la cual puede cambiar fácilmente a fermentación de ácido propiónico a pH mas alto.

3.16.2 pH

La figura 3.25 muestra el comportamiento del pH durante la operación del reactor, se tuvo un mejor control del pH, aunque tiende a disminuir a medida que pasan los ciclos. Cuando esto ocurría se decidía parar la operación del reactor, puesto que la producción de H₂ empezaba a disminuir también, sin recuperarse.

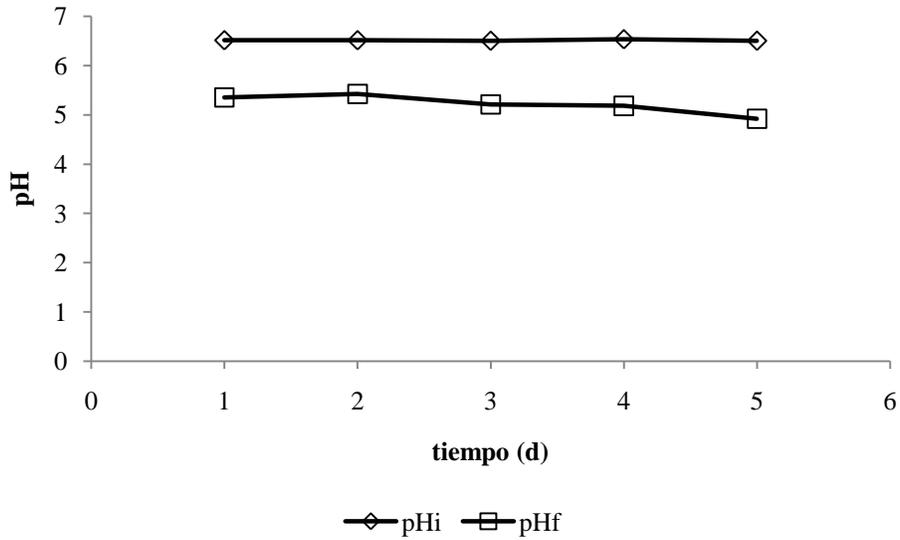


Figura 3.25. Comportamiento del pH durante la producción de H₂. 2g/L CaCO₃

3.17 Producción de H₂ controlando el pH con 3 g/L CaCO₃

El mal desempeño de los reactores se asoció con la caída del pH por lo que se decidió hacer un experimento más usando una concentración más alta de CaCO₃ (3g/L) y evaluar el desempeño del reactor bajo esta condición. Se trató de mantener el pH del medio en 6.5 y. La figura 3.26 muestra el desempeño de dicho reactor.

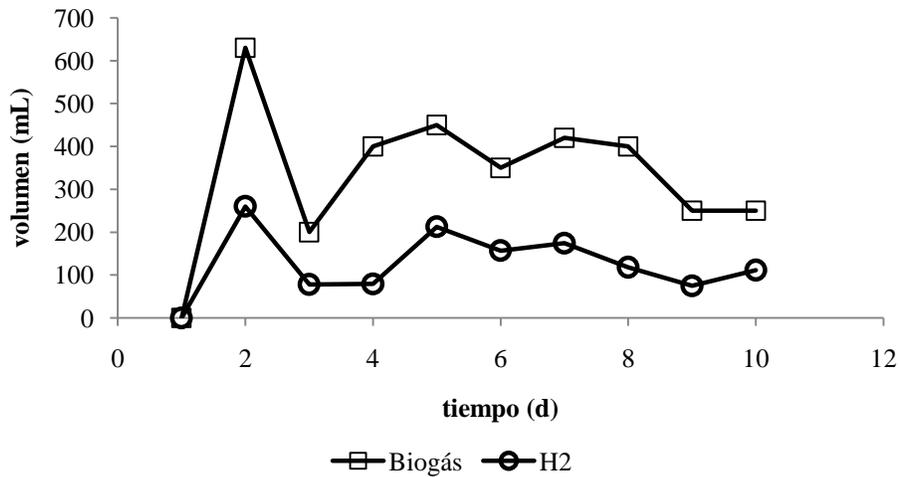


Figura 3.26. Producción de H₂ cuando se usa 3g/L de CaCO₃ para controlar el pH.

La figura 3.26 muestra que el reactor presentó un buen desempeño, lo cual fortalece la hipótesis de que el pH ha afectado todas estas series de experimentos ya que el medio tenía un pH mayor a 6 durante cada ciclo. Sin embargo, nuevamente a medida que pasan los ciclos la producción de H₂ (no de biogás) empieza a disminuir, por lo que se asume un cambio en la composición del consorcio microbiano debido a las condiciones ambientales (producción de AGV principalmente) lo que se puede apreciar en la figura 3.27.

3.17.1 Ácidos grasos volátiles

El reactor presentó una alta producción de ácido acético (2231 mg/L) con respecto a las pruebas anteriores. Sin embargo, nuevamente esta producción no se relacionó con una alta producción de H₂ como se esperaba. La explicación de esto es que es posible la existencia de bacterias homoacetogénicas, principalmente clostridia homoacetogénica, que crece heterotróficamente convirtiendo los azúcares simples a acetato sin producir hidrógeno. De esta manera resulta inadecuado hacer uso de la producción de ácido acético como un indicador del desempeño del reactor (Chen et al., 2009). Además también algunas veces, comunidades bacterianas con el mismo perfil de composición resultan en diferentes rendimientos de producción de H₂, indicando que la producción no es cambiada como respuesta a los cambios en la comunidad bacteriana, sino debida a un cambio en la ruta metabólica en respuesta a las condiciones ambientales (Hung et al., 2011)

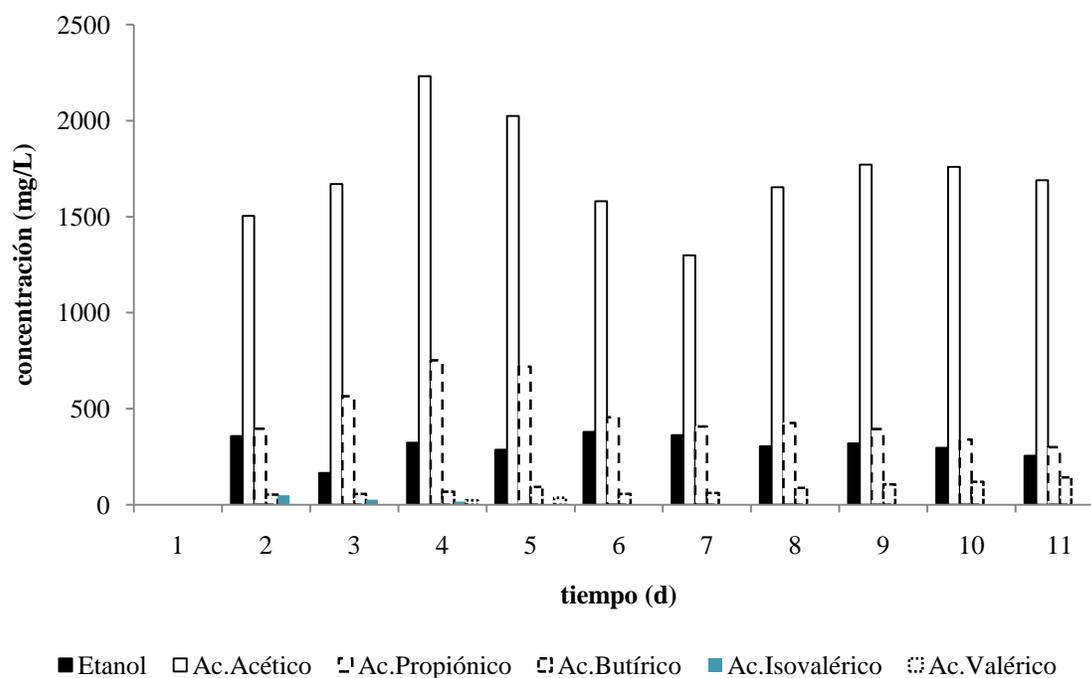


Figura 3.27. Productos finales de la fermentación cuando se usa 3g/L CaCO₃

Por otro lado los resultados aquí encontrados contrastan con los de Leite *et al.*(2008), quien reportó que el aumento en la alcalinidad de 0 a 1 g/L provocó el cese total de la producción de ácidos orgánicos, ya que el pH arriba de 5 afectó la fermentación ácida, y que además un incremento de la concentración de bicarbonato de sodio de 0 a 2 g/L causó que la concentración de ácido butírico y ácido capríico disminuyeran y que aumentara el contenido de ácido propiónico, y que la concentración de ácido acético no se verá afectada por la alcalinidad del agua residual.

La figura 3.28 muestra el comportamiento del pH durante esta prueba. Se observa una tendencia a disminuir a medida que va aumentando el número de ciclos, cuando esto ocurre la producción de H_2 va en decaimiento hasta llegar a cero, por lo que se concluye que el pH tiene un fuerte impacto sobre la producción de H_2 . Sin embargo, también se asume que es posible que se haya tratado de un consorcio microbiano pobre en bacterias productoras de H_2 ya que en las pruebas de evaluación del tipo de biopelícula no se tuvo un control de pH y no se tuvieron este tipo de problemas.

3.17.2 pH

Con base en los resultados obtenidos se recomienda probar otras estrategias de control de pH. Se ha reportado en algunos estudios que un pH inicial en el rango de 4 – 4.5 favorece la producción de H_2 aunque causa periodos lag mas largos que un pH inicial alrededor de 9. Sin embargo, la producción de H_2 decrece a pH inicial alto. Ha sido reportado que a pH altos se tiene una rápida producción de H_2 pero también una rápida producción de ácidos que alcanzan niveles inhibitorios los cuales simultáneamente disminuyen la capacidad amortiguadora de las soluciones buffer. Como resultado las bacterias podrían no adaptarse a los cambios rápidos en su ambiente y mueren. Pero por otro lado en un pH inicial bajo, el ambiente podría no ser el más favorable para las bacterias. Sin embargo, una vez adaptadas, las bacterias producen H_2 gradualmente a una velocidad moderada por tiempos mas largos (Sinha & Pandey, 2011).

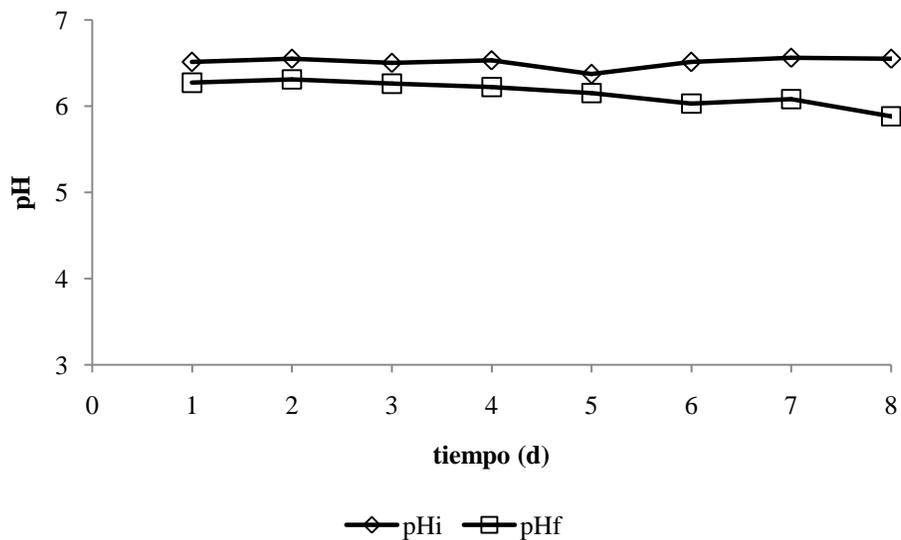


Figura 38. Comportamiento del pH durante la producción de H_2 cuando se controla con 3g/L $CaCO_3$.

3.18 Comparación de los sistemas

Los resultados obtenidos muestran que no existe una ventaja considerable en la producción de H_2 cuando se agrega $CaCO_3$ como una forma de controlar el pH. Esto es similar a lo reportado por Amorin *et al.*, (2010). Ellos reportan que la producción de H_2 puede lograrse ya sea agregando o no $CaCO_3$ sin que haya una diferencia significativa.

Tabla 3.7. Resultados del efecto de la alcalinidad sobre la producción de hidrógeno

| CaCO₃ | Biogás (mL) | H₂ (mL) | pH_{final} |
|-------------------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0 | 180 | 77 | 4.48 |
| 2 | 460 | 251 | 4.92 |
| 3 | 250 | 111 | 5.88 |

Los resultados obtenidos muestran que un proceso que emplea biomasa fija en forma de biopelícula, se ve impactado por el tipo de biopelícula desarrollada. De acuerdo a los resultados, una biopelícula delgada es la ideal para la producción de H₂, mientras que una biopelícula gruesa propiciará el crecimiento de bacterias no productoras o consumidoras de H₂. El tipo de biopelícula que se desarrolle dentro de un reactor de biomasa fija, está directamente relacionado con el tipo de empaque empleado. De acuerdo con este estudio un empaque poroso generará una biopelícula gruesa y se obtendrá una biopelícula delgada cuando se tenga un empaque plástico. Este estudio muestra también que el tipo de inóculo empleado tiene influencia en la producción de H₂, cuando se emplea un inóculo que proviene de un reactor bien operado se tendrá un inóculo estable y especializado lo que lo hace inadecuado para la producción de H₂, mientras que un lodo floculento y con mayor diversidad microbiana resultará en mayores rendimientos en cuanto a la producción de H₂. Los resultados de las pruebas realizadas para determinar efecto de la alcalinidad del medio sobre la producción de H₂, como una forma de mejorar el desempeño del inóculo 2, muestran que cuando se emplea un tipo de inóculo proveniente de un reactor estable es difícil tener un efecto en su desempeño.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

Fue posible la producción de hidrógeno en un reactor con biomasa fija a través de la inmovilización de la biomasa productora de hidrógeno en dos diferentes tipos de empaque, un empaque cerámico y un empaque de polietileno. Siendo el reactor empacado con medio de soporte plástico el que mostró un mejor desempeño.

De acuerdo a la evaluación de la colonización de dichos reactores, se encontró que el soporte cerámico fue colonizado con mas alta concentración de SSV (2270 mg SSV/ m²) que el soporte plástico (1145 mg SSV/m²), esto puede deberse a las propiedades del empaque, como rugosidad y porosidad.

Se observó que el tipo de biopelícula empleado en los reactores tiene influencia sobre la producción de H₂, el reactor empacado con medio de soporte plástico, el reactor A, presentó los mejores resultados en cuanto a la producción de hidrógeno, independientemente del tipo de inóculo utilizado. Siendo de 0.8 y 0.14 mol/mol de glucosa para A1 y A2 respectivamente. Mientras que para el reactor empacado con medio de soporte cerámico, reactor B, los rendimientos alcanzados fueron de 8 y 7 mmol/mol de glucosa para B1 y B2, respectivamente. Esta diferencia puede deberse a que en capas gruesas de biopelícula pueden desarrollarse microorganismos no productores y/o consumidores de hidrógeno llevando a una baja producción del mismo. La alta producción de ácido propiónico en el reactor empacado con medio de soporte cerámico poroso inhibió la producción de hidrógeno. Esto puede deberse al crecimiento de microorganismos diferentes a los productores de hidrógeno.

Los resultados mostraron que el tipo de inóculo tiene influencia en la producción de H₂. El inóculo 2 mostro la misma actividad metanogénica (0.43 gDQO CH₄/ SSV-d) que el inóculo 1, recién muestreado, aun cuando estuvo almacenado en una cámara fría durante un año. Esto aunado a la apariencia física de los flóculos (flóculos bien definidos) sugiere que el inóculo 2 proviene de un reactor bien controlado que ha seleccionado su consorcio microbiano siendo pobre en bacterias productoras de H₂.

Se encontró que no existe una ventaja considerable en la producción de H₂ cuando se agrega CaCO₃ como una forma de controlar el pH. Esto estuvo relacionado con el tipo de inóculo empleado.

RECOMENDACIONES

De acuerdo a los observado en el desarrollo de este trabajo, dar seguimiento de manera estricta el valor del pH cuando no se tiene un control automático, ya que es difícil de mantenerse dentro de los valores adecuados durante los ciclos de operación, y es un factor determinante en el desarrollo del consorcio microbiano y por lo tanto de los productos obtenidos.

Una vez hechos estos experimentos se sugiere llevar a cabo la operación en continuo de los reactores, donde se espera se alcancen mayores rendimientos en cuanto a la producción de H₂.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amorin ELC, Barros AR, Silva EL. (2010) Effect of Alkalinity and Organic Loading Rate in the Fermentative H₂ Production from an Anaerobic Fluidized Bed Reactor. 18th World Hydrogen Energy Conference 2010 - WHEC 2010

Argun H, Kargi F, Kapdan IK, Oztekin R. (2008) Biohydrogen production by dark by dark fermentation of wheat powder solution: effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *Int J Hydrogen Energy*. 33: 1813-1819.

Arooj MF, Han SK, Kim SH, Kim DH, Shin HS. (2008) Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. *Int J Hydrogen Energy*;33:3289-94.

Bai MD, Chao YC, Lin YH, Lu WC, Lee HT. (2009) Immobilized biofilm used as seeding source in batch biohydrogen fermentation. *Renewable Energy*.34:1969-1972.

Baisaillon A, Turcot J, Hallenbeck PC. (2006) The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. *Int J Hydrogen Energy*;31:1504-8.

Brentner LB, Peccia J, Zimmerman JB. (2010) Challenges in developing biohydrogen as a sustainable energy source: Implications for a research agenda. *Environ Sci Technol*. 44:2243-2254.

Buitrón G., y Carvajal C. (2010) Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 101, 9071-9077

Carvajal MC. (2009) Tesis de Maestría "Efecto de la temperatura sobre la producción de hidrógeno a partir de las aguas residuales" Universidad Nacional Autónoma de México.

Castelló E, Garcia y Santos C, Iglesias T, Paolino G, Wenzel J, Borzacconi L, Etchebere C. (2009) Feasibility of biohydrogen production from cheese whey

Chang FY, Lin CY. (2004) Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *Int J Hydrogen Energy*;29:33-9.

Chang FY, Lin CY. (2006) Calcium effect on fermentative hydrogen production in an anaerobic up-flow sludge blanket system. *Water Sci Technol*; 54:105-12.

Chang JS, Lee KS, Lin PJ. (2002) Biohydrogen Production with fixed-bed bioreactors. *Int J Hydrogen Energy*. 27:1167-1174.

Chen CC, Chen HP, Wu JH, Lin CY.(2008) Fermentative hydrogen production at high sulfate concentration. *Int J Hydrogen Energy*;33:1573–8.

Chen SD, Sheu DS, Chen WM, Lo YC, Huang TI, Lin CY.(2007) Dark hydrogen fermentation from hydrolyzed starch treated with recombinant amylase originating from *Caldimonas taiwanensis* On1. *Biotechnol Prog* ;23:1312–20.

Chen WH, Chen SY, Khanal SK, Sung S.(2006) Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. *Int J Hydrogen Energy*;31:2170–8.

Chen WH, Sung S, Chen SY. (2009) Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects. *Int J Hydrogen Energy*. 34:227-234.

Chen WM, Tseng ZJ, Lee KS, Chang JS.(2005) Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *Int J Hydrogen Energy*;30:1063–70.

Cheng CH, Hung CH, Lee KS, Liao PY, Liang CM, Yang LH, Lin PJ, Lin CY. (2008) Microbial community structure of a starch-feeding fermentative hydrogen production reactor operated under different incubation conditions. *Int J Hydrogen Energy*. 33:5242-5249.

Cheong DY, Hansen CL. (2006) Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. *Appl Microbiol Biotechnol*;72:635–43.

Chin HL, Chen ZS, Chou CP. (2003) Fedbatch operation using *Clostridium acetobutylicum* suspension culture as biocatalyst for enhancing hydrogen production. *Biotechnol Prog*;19:383-388.

Collect C, Adler N, Schwitzguébel JP, Péringer P.(2004) Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *Int J Hydrogen Energy*;29:1479-1485.

Costerton JW. (1999) Introduction to biofilm. *Int J Antimicrobial Agents*. 11: 217-221.

Davila G, Cota CB, Rosales LM, De leon A, Razo E. (2009) Continuous biohydrogen production using cheese whey: improving the hydrogen production rate. *Int J Hydrogen Energy*. 34:4296-4304.

Davila G, Alatraste F, de León A, Razo E. (2008) Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: influence of initial substrate concentration and pH. *Int J Hydrogen Energy*;33:4989–97.

Doi T, Matsumoto H, Abe J, Morita S. (2009) Feasibility study on the application of rhizosphere microflora of rice for the hydrogen production from wasted bread. *Int J Hydrogen Energy*. 34: 1735-1743.

Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem*. 28:350–356.

Evvyernie D, Morimoto K, Karita S, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K.(2001) Conversion of chitinous wastes to hydrogen gas by *Clostridium paraputrificum* M-21. *J Biosci Bioeng*;91:339–43.

- Fabiano B, Perego P.(2002) Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *Int J Hydrogen Energy*;27:149–56.
- Fan YT, Zhang GS, Guo XY, Xing Y, Fan MH.(2006) Biohydrogenproduction from beer lees biomass by cow dung compost.*Biomass Bioenergy*;30:493–6.
- Fang H.H.P., Zhang T., Li C. (2006) Characterization of Fe-hydrogenase genes diversity and hydrogen producing population in acidophilic sludge. *J. Biotechnol.* 126: 357-364.
- Fang HHP, Li CL, Zhang T.(2006) Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *Int J Hydrogen Energy*;31:683–92.
- Fang HHP, Liu H, Zhang T. (2002) Characterisation of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnol Bioeng.* 78:44-52.
- Fang HHP, Zhang T, Liu H (2002) Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge. *Appl Microbiol Biotechnol.* 58:112-118.
- Ferchichi M, Crabbe E, Gil GH, Hintz W, Almadidy A.(2005) Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *J Biotechnol.* 120:402-9
- Franklin R, Koevoets WAA, van Gils WMA, Van der Pas A, (1992) application of the Biobed upflow fluidized-bed process for anaerobic waste water treatment. *Water Sci Technol.* 25:373-382.
- Gavala HN, Skiadas IV, Ahring BK.(2006) Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. *Int J Hydrogen Energy*;31:1164–75.
- Gunjer W. & Zehnder AJB. (1983) Conversion processes in anaerobic granular sludge. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands
- Guo L, Li XM, Bo X, Yang Q, Zeng GM, Liao DX, (2008) Impacts of sterilization, microwave and ultrasonication pretreatment on hydrogen producing using waste sludge.*Bioresour Technol*;99:3651–8.
- Hallenbeck PC, Ghosh D. (2009) Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology* 27: 287-297.
- Hawkes FR., Disnsdale R, Hawkes DL, Hussy I. (2002) Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. *Int J Hydrigen Energy.* 27:1339-1347.
- Hawkes RF, Hussy I, Kyazze G, Dinsdale R, Hawkes DL.(2007) Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *Int J Hydrogen Energy.* 32: 172-184.
- Holo H, Faye T, Brede DA, Nilsen T, Ødegard I, Lansurd T. (2002) Bacteriocins of propionic acid bacteria. *Lait* 82:59–68.
- Hu B, Chen SL.(2007) Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *Int J Hydrogen Energy*; 32:3266–73.

Huang Y, Zong W, Yan X, Wang R, Hemme CL, Zhou J, Zhou Z. (2010) Succession of the bacterial community and dynamics of hydrogen producers in a hydrogen-producing bioreactor. *Appl Environ Microbiol.* 76:3387-3390.

Hung CH, Cheng CH, Guan DW, Wang ST, Hsu CS, Liang CM, Lin CY. (2011) Interactions between *Clostridium* sp. and other facultative anaerobes in a self-formed granular sludge hydrogen-producing bioreactor. *Int J Hydrogen Energy.*36: 8704-8711.

Hung CH, Chabg YT, Chang YJ. (2011) Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems. Technol. hydrogen yield and formation rate. *International Journal of Hydrogen Energy.*

Ishikawa M, Yamamura S, Takamura Y, Sode K, Tamiya E, Tomiyama M.(2006) Development of a compact high-density microbial hydrogen reactor for portable bio-fuel cell system. *Int J Hydrogen Energy*;31:1484–9.

Iyer P, Bruns MA, Logan BE. (2004) H₂-producing bacterial communities from a heat-treated soil incolum. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66:166-173.

Jianzheng L , Nanqi R, Baikun L, Zhi Q , Junguo H.(2008) Anaerobic biohydrogen production from monosaccharides by a mixed microbial community culture. *Bior Tech.* 99:6528-6537.

Jo JH, Lee DS, Park D, Choe WS, Park JM.(2008) Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods. *Bioresour Technol*; 99:2061–6.

Kanai T, Imanaka H, Nakajima A, Uwamori K, Omori Y, Fukui T. (2005) Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J Biotechnol*; 116:271–82.

Karapinar KI, Kargi F. (2006) Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzy Microl Technol.* 38:569-582.

Kawasgoshi Y, Hino N, Fujimoto A, Nakao M, Fujita Y, Sugimura S, Furukawa K (2005) Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacteria community relevant to hydrogen production. *J Biosci Bioeng.*100: 524-530.

Khanal SK, Chen WH, Li L, Sung S. (2004) Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *Int J Hydrogen Energy* 29:1123–31.

Kim DH, Kim SH, Ko IB, Lee CY, Shin HS. (2008) Start-up strategy for continuous fermentative hydrogen production: Early switchover from batch to continuous operation. *Int J Hydrogen Energy*33:1532 – 1541.

Kim JO, Kim YH, Ryu JY, Song BK, Kim IH, Yeom SH. (2005) Immobilization methods for continuous hydrogen gas production biofilm formation versus granulation. *Process Biochem*; 40 :1331–1337

- Kim SH, Han SK, Shin HS.(2006) Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochem*; 41:199–207.
- Koskinen PEP, Kaksonen AH, Puhakka JA. (2007) The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidised-bed bioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 97: 742-758.
- Kotay SM, Das D. (2008) Biohydrogen as a renewable energy resource. Prospects and potentials. *Int J of Hydrogen Energy*. 33:258-263.
- Kumar N, Das D. (2000) Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochem* ;35:589–93.
- Kumar N, Das D.(2001) Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices. *Enzyme Microb Technol*;29:280–7.
- Lalit V, Venkata S, Sarma PN. (2009) Influence of reactor configuration on fermentative hydrogen production during wastewater treatment. *Int J Hydrogen Energy*.34:3305-3312.
- Lay JJ, Fan KS, Hwang JI, Chang JI, Hsu PC. (2005) Factors affecting hydrogen production from food wastes by *Clostridium*-rich composts. *J Environ Eng*;131:595–602.
- Lay JJ. (2001) Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. *Biotechnol Bioeng*.74:280-287.
- Lee KS, Hsu YF, Lo YC, Lin PJ, Lin CY, Chang JS.(2008) Exploring optimal environmental factors for fermentative hydrogen production from starch using mixed anaerobic microflora.*Int J Hydrogen Energy*;33:1565–72.
- Lee KS, Lin PJ, Chang JS.(2006) Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. *Int J Hydrogen Energy*;31:465–72.
- Lee KS, Lin PJ, Fangchiang K, Chang JS.(2007) Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor. *Int J Hydrogen Energy*;32:950–7.
- Lee KS, Lo YS, Lo YC, Lin PJ. (2004) Chang JS. Operation strategies for biohydrogen production with a high-rate anaerobic granular sludge bed bioreactor. *Enzyme Microb Technol*;35:605–12.
- Lee YJ, Miyahara T, Noike T.(2001) Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. *Bioresour Technol*; 80:227–31.
- Lee YJ, Miyahara T, Noike T.(2002) Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. *J Chem Technol Biotechnol*;77:694–8.
- Leite JAC, Fernandes BS, Pozzi E, Barbosa M, Zaiat M. (2008). Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. *Int J Hydrogen Energy*; 33:) 579 – 586

- Levin DB., Pitt L., Love M. (2004) Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int J Hydrogen Energy*. 29: 173-185.
- Levin DB, Islam R, Cicek N, Sparling R.(2006) Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *Process Biochem*; 31:1496–503.
- Li CL, Fang HHP,(2007) Inhibition of heavy metals on fermentative hydrogen production by granular sludge. *Chemosphere*;67:668-73.
- Lin CY, Chang CC, Hung CH.(2008) Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures. *Int J Hydrogen Energy*;33:2445–53.
- Lin CY, Cheng CH.(2006) Fermentative hydrogen production from xylose using anaerobic mixed microflora. *Int J Hydrogen Energy*;31:832–40.
- Lin CY, Hung CH, Chen CH, Chung WT, Cheng LH.(2006) Effects of initial cultivation pH on fermentative hydrogen production from xylose using natural mixed cultures. *Process Biochem*;41:1383–90.
- Lin CY, Lay CH.(2004) Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *Int J Hydrogen Energy*;29:41–5.
- Lin CY, Lee CY, Tseng IC, Shaio IZ.(2006) Biohydrogen production from sucrose using base-enriched anaerobic mixed microflora. *Process Biochem*. 41:915-919.
- Liu GZ, Shen JQ. (2004) Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. *J Biosci Bioeng*;98:251–6.
- Liu H, Fang HHP. (2002) Fermentative hydrogen production from wastewater by acidogenic granular sludge. *Water Sci Technol*. 47: 153-158.
- Lo YC, Chen WM, Hung CH, Chen SD, Chang JS.(2008) Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies. *Water Res*;42:827–42.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem*. 193: 265-275.
- Lu Y, Lai Q, Zhang C, Zhao H, Ma K, Zhao X, Chen H, Liu D, Xing XH. (2009) Characteristics of hydrogen and methane production from cornstalks by an augmented two or three stage anaerobic fermentation process. *Bioresour Technol*. 100:2889-2895.
- Mizuno O, Dinsdale R, Hawkes FR, Hawkes DL, Noike T. (2000) Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresour Technol*. 73: 59–65.
- Mohan SV, Babu VL, Sarma PN.(2008) Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresour Technol*;99:59–67.

Montes MA, Moreno G, Buitrón G. (2007). Influences of inoculum source, pH and temperature on hydrogen production. Oral presentation, Brisbane, Australia, 2007.

Morimoto M, Atsuko M, Atif AAY, Ngan MA, Fakhru'l-Razi A, Iyuke SE, et al.(2004) Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. *Int J Hydrogen Energy*;29:709–13.

Mu Y, Yu HQ, Wang Y. (2006). The role of pH in the fermentative H₂ production from an acidogenic granule-based reactor. *Chemosphere*;64:350–8.

Mu Y, Zheng XJ, Yu HQ, Zhu RF.(2006) Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. *Int J Hydrogen Energy*;31:780–5.

Nakashimada Y, Rachman MA, Kakizono T, Nishio N.(2002)Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. *Int J Hydrogen Energy*; 27:1399–405.

Nicolella C, van Loosdrecht MC, Heijnen J. (2000) Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *J Biotechnol*.80: 1-33.

Nisilä ME, Tähti HP, Rintala JA, Puhakka JA. (2001) Effects of heat treatment on hydrogen production potential and microbial community of thermophilic compost enrichment cultures. *Bioresour Technol*. 102: 4501-4506.

Ntaikou I, Gavala Hariklia N, Kornaros M, Lyberatos G. (2008) Hydrogen production from sugars and sweet sorghum biomass using *Ruminococcus albus*.*Int J Hydrogen Energy*. 33: 1153-1163.

Ogino H, Miura T, Ishimi K, Seki M, Yoshida H.(2005) Hydrogen production from glucose by anaerobes. *Biotechnol Prog*; 21:1786–8.

Oh YK, Kim HJ, Park S, Kim MS, Ryu DDY.(2008) Metabolic-flux analysis of hydrogen production pathway in *Citrobacter amalonaticus* Y19. *Int J Hydrogen Energy*;33:1471–82.

O-Thong S, Prasertsan P, Intrasungkha N,Dhamwichukorn S, Birkeland NK.(2008) Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge. *Int J Hydrogen Energy*;33:1221–31.

Pan CM, Fan YT, Xing Y, Hou HW, Zhang ML.(2008) Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. *Fanp2. Bioresour Technol*;99:3146–54.

Podesta JJ, Gutierrez-Navarro AM, Estrella CN, Estes MA.(1997) Electrochemical measurement of trace concentrations of biological produced by *Enterobacteriaceae*. *Res Microbiol* ;148:87-93.

Ren N, Li J, Li B, Wang Y, Lui S. (2006) Biohydrogen production form molasses by anaerobic fermentation with pilot-scale bioreactor system. *Int J Hydrogen Energy* 31:2147-2157.

Rocha A, Luceba E, Marques C, Momoe G, Luiz E.(2010) Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactor: Effect of support material and hydraulic retention time. *Int J Hydrogen Energy*.;35:3379-3388.

Salerno MB, Park W, Zuo Y, Logan BE. (2006) Inhibition of biohydrogen production by ammonia. *Water Res*;40:1167–72.

Saphirun P, Reungsang A. (2011) Biological hydrogen production from sweet sorgun syrup by mixed culture using an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). *Int J Hydrogen Energy* 36: 8765-8773.

Shin HS, Youn JH, Kim SH. (2004) Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int J Hydrogen Energy*;29:1355–63.

Shirliff ME, Mader JT, Camper AK. (2002) Molecular Interaction in Biofilms. *Chemistry & Biology*. 9: 859-871.

Sinha P, Pandey A. (2011) An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *Int J Hydrogen Energy*. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2011.03.077

Skonieczny MT, Yargeau V. (2009) Biohydrogen production from wastewater by *Clostridium beijerinckii*: effect of pH and substrate concentration. *Int J Hydrogen Energy*.34:3288-3294.

Sreethawong T, Chatsiriwatana S, Rangsunvigit P, Chavadej S. (2010) Hydrogen production from cassava wastewater using anaerobic sequencing batch reactor: effects of operational parameters, COD:N ratio, and organic and acid composition. *Int J Hydrogen Energy*. 35:4092-4102.

Stickler D. (1999) Biofilms. *Current Opinion en Microbiology*. 2: 270-275.

Taguchi F, Yamada K, Hasegawa K, Taki-Saito T, Hara K.(1996) Continuous hydrogen production by *Clostridium* sp. Strain no. 2 from cellulose hydrolysate in an aqueous two-phase system. *J Ferment Bioeng*;82:80–3.

Taguchi F, Mizukami N, Saito-Taki T, Hasegawa K. (1995) Hydrogen production from continuous fermentation of xylose during growth of *Clostridium* sp Strain no.2. *Canadian Journal of Microbiology*; 41; 536-540.

Tanisho S, Ishiwata Y.(1995) Continuous hydrogen production from molasses by fermentation using urethane foam as a support of flocks. *Int J Hydrogen Energy*;20:541–5.

Ting CH, Lin KR, Lee DJ, Tay JH. (2004) Production of hydrogen and methane from wastewater sludge using anaerobic fermentation. *Water Sci Technol*;50:223–8.

Turcot J, Bisaillon A, Hallenbeck PC.(2008) Hydrogen production by continuous cultures of *Escherchia coli* under different nutrient regimes. *Int J Hydrogen Energy*;33:1465–70.

Ueno Y, Haruta S, Ishii M, Igarashi Y. (2001) Characterization of a microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora. *J Biosci Bioeng*; 92:397–400.

Ueno Y, Sasaki D, Fuki H, Haruta S, Ishii M, Igarashi Y. (2006) Changes in bacterial community during fermentative hydrogen and acid production from organic waste by thermophilic anaerobic microflora. *J Appl Microbiol*. 101:331-343.

- Valdez V I, Poggi V HM. (2009) Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 13: 1000-1013.
- Van GS, Sung S, Lay JJ. (2001) Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environ Sci Technol*;35:4726–30.
- Van Neil EWJ, Budde MAW, de Haas GG, van der Wal FJ, Claassen PAM, Stams AJM. (2002) Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfii*. *Int J Hydrogen Energy*; 27:1391–8.
- Wan Wei. (2009) Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Int J Hydrogen Energy*. 34:799-811.
- Wang CC, Chang CW, Chu CP, Lee DJ, Chang BV, Liao CS. (2003) Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. *J Biotechnol*;102:83–92.
- Wang CH, Lin PJ, Chang JS.(2006) Fermentative conversion of sucrose and pineapple waste into hydrogen gas in phosphate-buffered culture seeded with municipal sewage sludge. *Process Biochem*;41:1353–8.
- Wang G, Mu Y, Yu HQ. (2005) Response surface analysis to evaluate the influence of pH, temperature and substrate concentration on the acidogenesis of sucrose-rich wastewater. *Biochem Eng J*;23:175–84.
- Wang JL, Wan W. (2008) Effect of Fe²⁺ concentrations on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *Int J Hydrogen Energy*;33:1215–20.
- Wang JL, Wan W.(2008) Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing cultures from digested sludge. *Int J Hydrogen Energy*; 33:2934–41.
- Wang JL, Wan W. (2009) Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Int J Hydrogen Energy*. 34:799-811.
- Wang JL, Wan W.(2008) Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *Int J Hydrogen Energy*;33:5392–7.
- Wang JL, Wan W.(2008) Influence of Ni²⁺ concentration on biohydrogen production. *Bioresour Technol*;99:8864–8.
- Wang L., Zhou Q., Li F.T.(2006) Avoiding propionic acid accumulation in the anaerobic process for biohydrogen production. *Biomass and Bioenergy* 30:177–182.
- Wang XJ, Ren NQ, Xiang WS, Guo WQ.(2007) Influence of gaseous end-products inhibition and nutrient limitations on the growth and hydrogen production by hydrogen-producing fermentative bacterial B49. *Int J Hydrogen Energy*; 32:748–54.
- Weiland P. (2010) Biogas Production: current state and perspectives. *Appl Microbial Biotechnol*. 85:849-860.

- Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. (2000) Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*. 24 : 661-671
- Won SG, Lau AK. (2011) Effects of key operational parameters on biohydrogen production via anaerobic fermentation in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*.102:6876-6883.
- Wu JH, Lin CY.(2004) Biohydrogen production by mesophilic fermentation of food wastewater. *Water Sci Technol*;49:223–8.
- Wu SY, Hung CH, Lin CY, Lin PJ, Lee KS, Lin CN. (2008) HRT-dependent hydrogen production and bacterial community structure of mixed anaerobic microflora in suspended, granular and immobilized sludge systems using glucose as the carbon substrate. *Int J Hydrogen Energy*. 33:1542–9.
- Wu SY, Lin CY, Lee KS, Hung CH, Chang JS, Lin PJ, et al.(2008b) Dark fermentative hydrogen production from xylose in different bioreactors using sewage sludge microflora. *Energy Fuels*;22:113–9.
- Xing DF, Ren NQ, Wang AJ, Li QB, Feng YJ, Ma F.(2008) Continuous hydrogen production of auto-aggregative *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 under non-sterile condition. *Int J Hydrogen Energy*;33:1489–95.
- Yang HJ, Shen JQ. (2006) Effect of ferrous iron concentration on anaerobic bio-hydrogen production from soluble starch. *Int J Hydrogen Energy*;31:2137–46.
- Yang P, Zhang R, McGarvey JA, Benemann J.R. (2007) Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *Int J Hydrogen Energy*. 32:4761-4771.
- Yokoi H, Ohkawara T, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y. (1995) Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter Aerogenes* strain HO-39. *J Ferment Bioeng*;80:571-574.
- Yokoi H, Tokushige T, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y. (1998) H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnol let*. 20:143-147.
- Yokoyama H, Waki M, Moriya N, Yasuda T, Tanaka Y, Haga K.(2007) Effect of fermentation temperature on hydrogen production from cow waste slurry by using anaerobic microflora within the slurry. *Appl Microbiol Biotechnol* ; 74:474–83.
- Yu HQ, Zhu ZH, Hu WR, Zhang HS. (2002) Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *Int J Hydrogen Energy*;27:1359–65.
- Zhang H, Bruns MA, Logan BE.(2006) Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. *Water Res*;40:728–34.
- Zhang ML, Fan YT, Xing Y, Pan CM, Zhang GS, Lay JJ. (2007) Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. *Biomass Bioenergy*;31:250–4.

- Zhang T, Liu H, Fang HHP.(2003) Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. *J Environ Manage*;69:149–56.
- Zhang ZP, Tay JH, Show KY, Yan R, Tee LD, Lee DJ, Jiang WJ.(2007) Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. *Int J Hydrogen Energy*.; 32:185-191.
- Zhang ZP, Show KY, Tay JH, Liang DT, Lee DJ, Jiang WJ. (2006) Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochem*;41:2118–23.
- Zhang ZP, Show KY, Tay JH, Liang DT, Lee DJ.(2008) Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors-A comparison of biofilm-based and granule-based systems. *Int J Hydrogen Energy*;33:1559–64.
- Zhao QB, Yu HQ. (2008) Fermentative H₂ production in an upflow anaerobic sludge blanket reactor at various pH values. *Bioresour Technol*;99:1353–8.
- Zheng H, Zeng RJ, Angelidaki I. (2008) Biohydrogen production from glucose in upflow biofilm reactors with plastic carriers under extreme thermophilic conditions (70 °C). *Biotechnol Bioeng* ; 100:1034–8.
- Zhu S, Wu Y, Yu Z, Chen Q, Wu G, Yu F, Wang C, Jin S. (2006) Microwave-assisted Alkali Pre-treatment of Wheat Straw and its Enzymatic Hydrolysis. *Biosys Eng*. 94:437-442.
- Zoutberg GR, Franklin R. (1996) Anaerobic treatment of chemical and brewry waste water with a new type of anaerobic reactor: the Biobed EGSB reactor. *Water Sci Technol*. 34: 375-381