

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE DOS ESTRATEGIAS DE OPERACIÓN PARA
LA OBTENCIÓN DE UN INÓCULO PRODUCTOR DE
BIOHIDRÓGENO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ELIA AURORA DANIELA MOLINA JIMÉNEZ

DIRIGIDA POR

Dr. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE DOS ESTRATEGIAS DE
OPERACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE UN INÓCULO
PRODUCTOR DE BIO-HIDRÓGENO”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

ELIA AURORA DANIELA MOLINA JIMÉNEZ

DIRIGIDA POR

Dr. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ

SINODALES

Dr. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ

DIRECTOR

Dr. SERGIO DE JESUS ROMERO GOMEZ

SINODAL

Dra. SOFIA MARIA ARVIZU MENDRANO

SINODAL

M.I. CHRISTIAN EDUARDO HERNÁNDEZ MENDOZA

SINODAL

M.S.P. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE LA FACULTAD DE QUÍMICA

FINANCIAMIENTO

Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante el proyecto 100298

Este trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Investigación de Procesos Avanzados de tratamiento de Agua de la Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería de la UNAM.

INDICE GENERAL

Contenido	Página
INDICE GENERAL	i
INDICE DE CUADROS	iv
INDICE DE FIGURAS	v
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Producción de energía en el mundo	1
1.2 Producción de biogás	3
1.3 Digestión anaerobia	3
1.4 Métodos utilizados para la producción de hidrógeno	6
1.4.1 Fermentación oscura	7
1.5 Principales enzimas utilizadas en la producción de hidrógeno	8
1.6 Microorganismos relacionados en la producción de hidrógeno	10
1.6.1 Fermentación ácido mixta	10
1.6.2 Fermentación butanodiólica	11
1.6.3 Fermentación butírica	12
1.7 Factores que afectan la producción de hidrógeno por fermentación oscura	14
1.7.1 Sustrato	14
1.7.2 Temperatura	14
1.7.3 pH	14
1.7.4 Tipos de inóculo	15
1.7.4.1. Retención de la biomasa en el reactor por medio de gránulos	17

1.7.5 Tipos de reactores utilizados para la producción de hidrógeno	18
1.8 Arranque del reactor productor de bio-hidrógeno	20
2. HIPOTESIS	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 Generales	25
3.2 Específicos	25
4. METODOLOGÍA	26
4.1 Inóculo	26
4.2 Sustrato	26
4.3 Procedimiento experimental	26
4.3.1 Operación del reactor anaerobio discontinuo secuencial	27
4.3.2 Operación del reactor en continuo	27
4.4 Técnicas analíticas	27
4.4.1 Determinación del consumo de glucosa	27
4.4.2 Caracterización del biogás	28
4.4.3 Ácidos grasos volátiles	28
4.4.4 Cuantificación de sólidos suspendidos volátiles, totales y fijos	29
4.4.5 Morfología de los gránulos	29
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1 Efecto del TRH sobre la morfología de los gránulos	30
5.1.1 Puesta en marcha en discontinuo	30
5.1.2 Puesta en marcha en continuo	32
5.2 Desempeño del reactor sobre la producción de bio-hidrógeno	33
5.2.1 Puesta en marcha en discontinuo	33

5.2.2 Puesta en marcha en continuo	34
5.3 Subproductos obtenidos durante las estrategias de puesta en marcha empleadas	36
5.3.1 Puesta en marcha en discontinuo	36
5.3.2 Puesta en marcha en continuo	37
6. DISCUSIÓN	38
7. CONCLUSIONES	41
7. BIBLIOGRAFIA	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Subproductos obtenidos durante la puesta en marcha en discontinuo	37
2	Subproductos obtenidos durante la puesta en marcha en continuo	38
3	Comparación de los resultados obtenidos con la puesta en marcha en discontinuo y en continuo	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Demanda energética en el mundo por tipo de combustible	2
2	Esquema de reacciones de la digestión anaerobia de materiales poliméricos	4
3	Enzimas involucradas en la fermentación mixta	11
4	Enzimas involucradas en la fermentación butanodiólica	12
5	Enzimas involucradas en la fermentación butírica	13
6	Composición de un gránulo de acuerdo a la teoría de gránulos formados por capas múltiples	18
7	Efecto del TRH en la morfología de los gránulos	31
8	Efecto de la operación en continuo sobre la morfología de los gránulos	32
9	Composición del biogás producido durante la operación discontinuo del reactor	34
10	Composición del biogás producido durante la operación continua del reactor	35

1. ANTECEDENTES

1.1. Producción de energía en el mundo

En los últimos años el uso de la energía en el mundo se ha incrementado de manera acelerada, lo cual ha provocado una gran preocupación por los elevados costos sociales y ambientales asociados al uso de la energía convencional, los combustibles fósiles y la energía nuclear.

Los ecosistemas se ven afectados por las emanaciones de las centrales eléctricas, la incineración de basura, el uso de vehículos de combustión interna, entre otros, además de producir daños en los mantos acuíferos, en la naturaleza, en la productividad agrícola, así como serios problemas de salud en la población.

La energía nuclear, opción elegida en las últimas décadas como la solución ideal para la producción de energía con el fin de evitar el gran problema de la contaminación, ha mostrado ser un problema de tal envergadura que muchos países han decidido erradicarla de sus planes energéticos para el futuro, no solo por la gran generación de residuos radiactivos que ello conlleva, sino por el grave problema que presenta el desmantelamiento de sus instalaciones, el riesgo de accidentes de altas consecuencias, así como el elevado costo de construcción y mantenimiento de las mismas. (Santamarta, 2006)

Como menciona Korskinen, 2008, la demanda actual de energía se ha incrementado considerablemente debido al crecimiento demográfico y al desarrollo económico y tecnológico. De acuerdo a las predicciones realizadas por Narotzky, 2011, se estima que para el año 2030 la demanda global de energía aumentará un 50 % (ver figura 1).

Los combustibles fósiles que se usan diariamente para cubrir nuestras demandas energéticas, reciben el nombre de energías no renovables debido a que su proceso de formación en la naturaleza requiere de largos periodos de tiempo y de condiciones fisicoquímicas especiales, por lo que su disponibilidad está limitada. La combustión de ésta fuente de energía emite diversos agentes contaminantes como

el CO_x, NO_x, SO_x, C_xH_x, hollín, cenizas y otros compuestos, los cuales al liberarse a la atmósfera han contribuido al proceso de cambio climático.

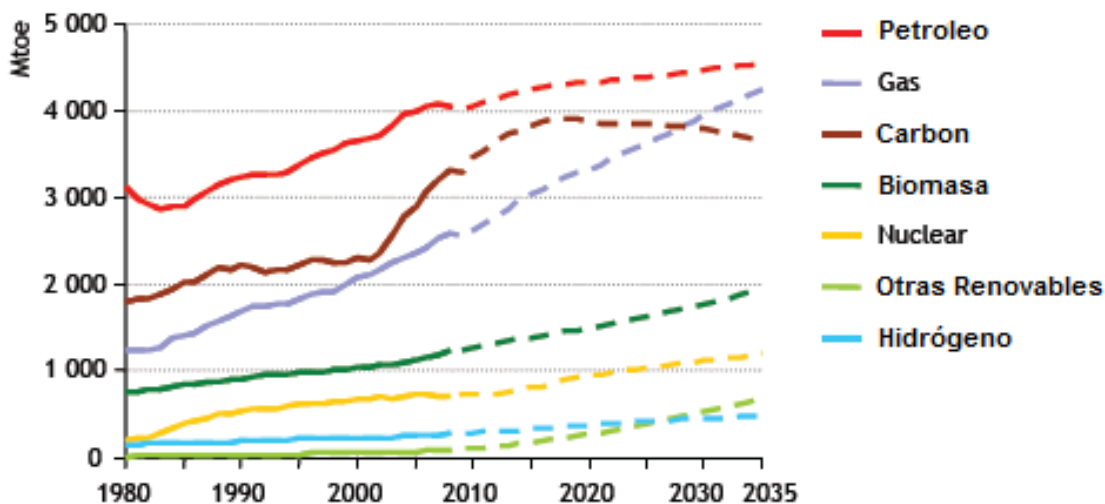


Figura 1. Demanda energética en el mundo por tipo de combustible.
Fuente: Narotzky, 2011

Si se toma en cuenta que alrededor del 80% de las necesidades energéticas a nivel mundial se satisfacen mediante el empleo de los combustibles de origen fósil (Sedigas, 2011) y que su disponibilidad es limitada, resulta necesario la búsqueda de nuevas fuentes de energía, las cuales deben ser renovables y amigables con el ambiente.

Las energías renovables son aquellas que se obtienen de fuentes naturales inagotables corto, tal es el caso de la energía eólica, hidráulica, geotérmica, mareomotriz y solar. El uso de éste tipo de energías presenta grandes ventajas; la principal es que no emiten gases como el CO_x y NO_x que causan daño a la atmósfera y producen el llamado efecto invernadero en el planeta. Sin embargo, su uso presenta en muchos casos una inversión inicial elevada y no está disponible de una manera continua en todo el mundo, ya que su obtención conlleva una estrecha relación con la zona donde se encuentren ubicadas las instalaciones y el lugar donde se utilice la energía generada.

1.2 Producción de biogás

El biogás es otra fuente de energía renovable resultado de una fermentación anaerobia que puede ser generada a partir de diversos materiales orgánicos (vegetales y animales) obteniendo una composición principalmente de metano (50-70 %), dióxido de carbono (25-45 %), agua (2 %), nitrógeno (menos a 2 %), oxígeno (menos a 2%), ácido sulfhídrico (menos a 1%) e hidrógeno (menos a 1 %). (Comisión Nacional de Energía).

Actualmente el biogás se utiliza para la producción de energía eléctrica mediante el empleo de motores de ciclo combinado. Sin embargo su combustión genera gases de efecto invernadero por lo cual es necesario la búsqueda de otras fuentes de energía más limpias. A nivel mundial se ha señalado al hidrógeno como el vector energético más sustentable, debido a que es posible obtenerlo durante el proceso de tratamiento anaerobio de las aguas residuales, posee un alto contenido energético por unidad de peso (120.9 kJ/g), en comparación con otros combustibles de origen fósil (gasolina: 48.3 kJ/g) y otros biocombustibles (metano: 50.02 kJ/g), y su combustión sólo genera agua como subproducto. (Debabrat y Veziroglu, 2001; Guervós, 2003).

1.3. Digestión anaerobia

Una opción sustentable para generar hidrógeno es el empleo de la biotecnología anaerobia, ya que combina el tratamiento de las aguas residuales con la obtención de biocombustibles y subproductos valiosos como los ácidos acético y butírico (Valdez-Vazquez, 2005).

Los procesos anaerobios son aquellos procesos biológicos en los cuales la materia orgánica se metaboliza en un ambiente libre de oxígeno disuelto o de sus precursores, como los sulfatos, nitritos, etc. Asimismo, se sabe que mediante el proceso de digestión anaerobia es posible generar biocombustibles a partir de la degradación de la materia orgánica.

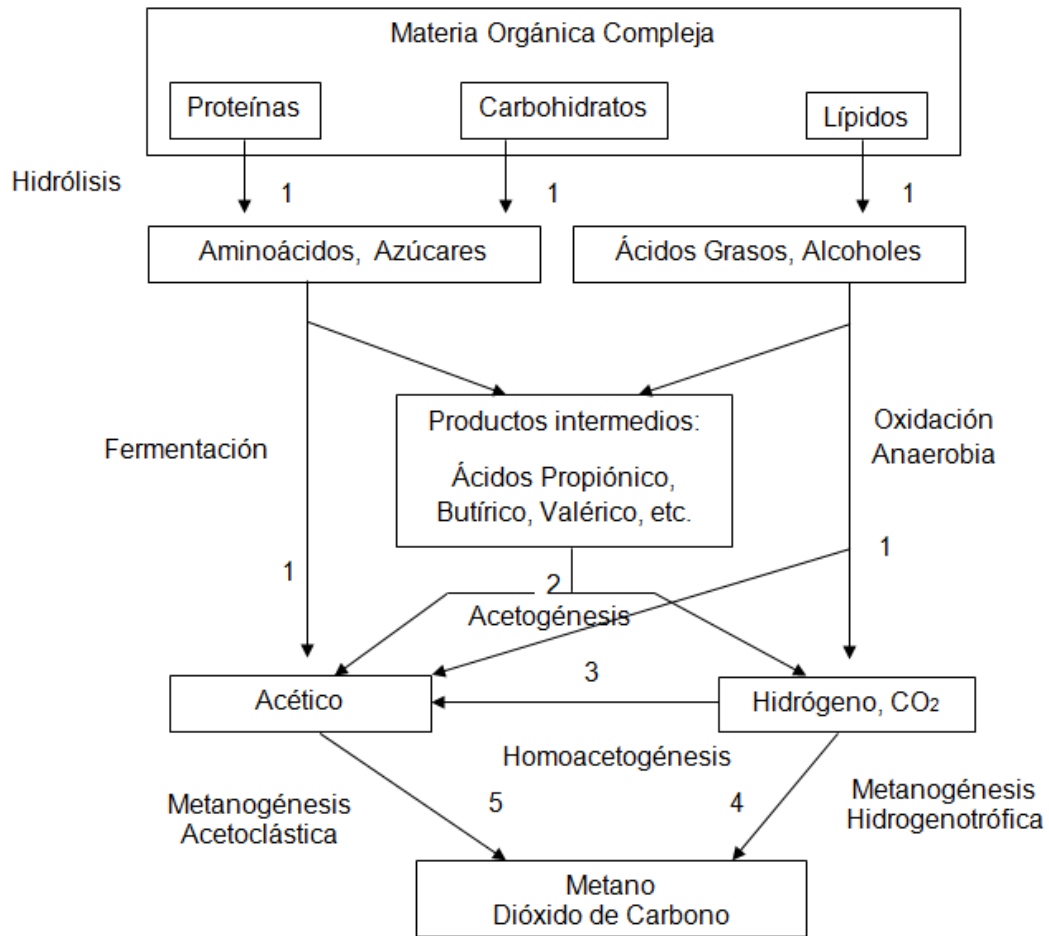


Figura 2. Esquema de reacciones de la digestión anaerobia de materiales poliméricos. Poblaciones microbianas responsables de cada proceso: 1. bacterias fermentativas; 2. bacterias acetogénicas que producen hidrógeno; 3. bacterias homoacetogénicas; 4. bacterias metanogénicas hidrogenotróficas; 5. bacterias metanogénicas acetoclásticas.

Fuente: Pavlosthatis y Giraldo-Gómez, 1991

La digestión anaerobia es un proceso biológico complejo por el número de reacciones químicas que suceden cuando diversos microorganismos degradan la materia orgánica para convertirla en dióxido de carbono y metano como producto final. La digestión anaerobia se lleva a cabo en cuatro fases o procesos con la intervención de diferentes grupos microbianos: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, y cuyas interacciones se pueden apreciar en la figura 2. Las fases de la digestión anaerobia se describen a continuación:

Primera fase: Hidrólisis

En la hidrólisis se lleva a cabo la conversión de los compuestos orgánicos complejos e insolubles a otros compuestos más sencillos y solubles en agua, ya que los microorganismos sólo pueden utilizar materia orgánica soluble que pueda atravesar su pared celular. Lo anterior se lleva a cabo por la acción de las enzimas extracelulares producidas por los microorganismos hidrolíticos. Esta etapa es fundamental para suministrar los compuestos orgánicos necesarios de forma tal que se puedan utilizar por las bacterias responsables de las siguientes fases.

Segunda fase: Acidogénesis

Durante esta etapa ocurre la fermentación de las moléculas orgánicas simples en compuestos que se pueden utilizar por las bacterias metanogénicas (ácido acético, ácido fórmico, hidrógeno) y en compuestos orgánicos más reducidos como los ácidos grasos volátiles (i.e. ácidos propiónico, butírico, láctico) y solventes (i.e. etanol, acetona) los cuales se oxidan por la acción de las bacterias acetogénicas en la siguiente fase del proceso.

Tercera fase: Acetogénesis

En la acetogénesis se utilizan los ácidos grasos volátiles (AGVs) como principales sustratos, los cuales se transforman en productos más sencillos como acetato, hidrógeno y dióxido de carbono por acción de las bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno.

Las bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno se inhiben por el hidrógeno que producen si éste se acumula en grandes cantidades, por lo que resulta necesario disminuir la cantidad de hidrógeno que se encuentra en el medio; por ello tienen una estrecha relación con los microorganismos consumidores de hidrógeno, como las arqueas metanogénicas hidrógenotróficas y las bacterias homoacetogénicas, las cuales actúan durante la acetogénesis manteniendo la presión parcial del hidrógeno a un nivel adecuado para que termodinámicamente

pueda darse la conversión de los AGVs en acetato e hidrógeno. Esta asociación se conoce como “relación sintrófica” o “transferencia interespecífica de hidrógeno”.

De esta manera no hay acumulación de AGVs en el sistema, lo que ocasionaría un descenso en el pH y por lo tanto la inhibición de las bacterias productoras de hidrógeno. Lo anterior se debe a que los microorganismos anaerobios no son capaces de mantener su pH interno constante en presencia de ácidos débiles, como el ácido acético y el ácido butírico, ya que su forma no disociada permite una libre permeabilidad a través de la membrana citoplasmática lo que ocasiona su acumulación en el interior de la célula descendiendo su pH interno (Gottwald y Gottschalk, 1985).

Cuarta fase: Metanogénesis

En esta fase las arqueas metanogénicas llevan a cabo la producción de metano y dióxido de carbono a partir de acetato, hidrógeno/dióxido de carbono, compuestos metilados y ciertos alcoholes bajo condiciones estrictamente anaerobias.

1.4. Métodos utilizados para la producción de hidrógeno

Actualmente, el método de producción de hidrógeno más utilizado es el reformado de gas natural que consiste en la exposición de gas natural a vapor muy caliente, obteniendo como resultado hidrógeno, dióxido de carbono y monóxido de carbono (Barry y Drolet, 2011).

El uso de la biomasa en lugar de los combustibles fósiles, reduce la cantidad de dióxido de carbono liberado a la atmósfera (Larsen y col., 2004). De acuerdo con Levin y col., 2003, y Hallenbeck y Benemann, 2002, la producción de hidrógeno a partir de la biomasa se puede llevar a cabo por medio de procesos termoquímicos y procesos biológicos que involucran la utilización de luz o no, los cuales se clasifican como: fotofermentación y fermentación oscura.

Aunque se ha estudiado la producción de hidrógeno por fotofermentación, la necesidad de contar con luz para poder llevar a cabo el proceso de producción ha

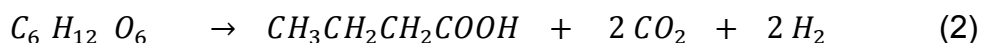
favorecido el estudio de la producción de hidrógeno por fermentación oscura sea más atractiva, pues no requiere la presencia de luz para producir hidrógeno de manera continua, además de que su velocidad de producción es mayor.

1.4.1. Fermentación oscura

Este proceso se lleva a cabo por bacterias anaerobias que no requieren una fuente de luz y utilizan sustratos ricos en carbohidratos para ser catabolizados en reacciones bioquímicas complejas y envuelven los tres primeros pasos de la digestión anaerobia. Las reacciones de fermentación pueden llevarse a cabo en condiciones mesofílicas (25-40 °C), termofílicas (40-65 °C), termofílicas extremas (65–80 °C) e hipertermofílicas (>80°C). (Levin y Chahine, 2009)

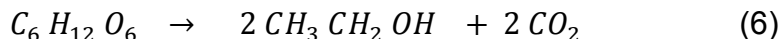
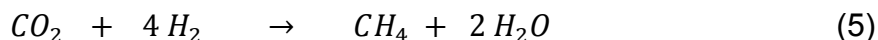
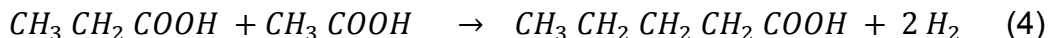
Este proceso genera principalmente hidrógeno y dióxido de carbono combinados con otros gases como el metano y el sulfuro de hidrógeno, dependiendo del proceso de reacción y el sustrato utilizado. (Ni y col., 2006)

Dependiendo del producto final obtenido durante la fermentación, ya sea acetato o butirato, es la cantidad de moles de hidrógeno obtenidos. Tomando a la glucosa como sustrato modelo, el rendimiento máximo teórico de la producción de hidrógeno es de 4 mol H₂/mol glucosa cuando el ácido acético es el producto final (reacción 1), y si el producto final es butirato, el rendimiento máximo teórico de hidrógeno es de 2 mol H₂/mol glucosa (reacción 2), tal como se presenta a continuación: (Ni y col., 2006)



Sin embargo, en la práctica una alta producción de hidrógeno se debe a una mezcla de fermentaciones de acetato y butirato, mientras que una baja producción de hidrógeno se encuentra asociada a los productos finales como el ácido

propiónico (reacción 3), ácido valérico (reacción 4), metano (reacción 5) y otros alcoholes (reacción 6). (Turker y col., 2008; Verma, 2002)



Algunas de las ventajas de la fermentación oscura son (Gomez y col., 2011; Hallenbeck, 2012):

2. Altas tasas de producción en términos de volumen del reactor.
3. No requiere de luz para la obtención de hidrógeno, lo cual para los reactores donde se utiliza la fotofermentación es una gran desventaja ya es necesario una fuente de luz continua debido a la alta demanda de energía de la nitrogenasa.
4. Se pueden utilizar diferentes sustratos.
5. Se pueden obtener altas tasas de producción utilizando microorganismos heterótrofos para la degradación anaerobia de la materia orgánica.
6. El uso de cultivos mixtos permite un funcionamiento estable cuando los residuos se utilizan como sustrato bajo operación continua.
7. Tecnologías de reactores fáciles de operar, por el contrario la fotofermentación requiere de fotobioreactores más complejos de operar.

1.5. Principales enzimas utilizadas para la producción de hidrógeno

Todos los procesos biológicos para la producción de hidrógeno están relacionados con la presencia de alguna de las dos enzimas productoras de hidrógeno: las nitrogenasas y las hidrogenasas.

Las nitrogenasas son enzimas fijadoras de nitrógeno esenciales para el ciclo de nitrógeno las cuales son muy lábiles ante la presencia de oxígeno. El complejo

nitrogenasa está compuesto por 2 proteínas: la dinitrogenasa y la dinitrogenasa reductasa, la cual tiene el rol específico de mediar la transferencia de electrones del donador externo de electrones (ferredoxina o flavodoxina) a la dinitrogenasa. Para realizar esta transferencia se requieren 2 moléculas de ATP y para que la dinitrogenasa acumule suficientes electrones para reducir el nitrógeno a amoníaco se requiere un mínimo de 16 ATP (Tamagnini y col., 2002). Este tipo de enzimas están presentes en microorganismos del tipo *Klebsiella*, *Azobacter*, *Cianobacterias* (algas verde-azuladas), *Rhizobium*, entre otros. (Mathews y col., 2002)

Hallenbeck y Benemann, 2002 indican que las nitrogenasas presentan una baja replicación (6.4 s^{-1}), y requieren grandes cantidades de energía para llevar a cabo la biosíntesis, necesitan ATP para llevar a cabo la catálisis por lo que no son una vía metabólica efectiva para la producción de hidrógeno.

Por otro lado las hidrogenasa se dividen en dos tipos dependiendo de su centro metálico, las FeFe- hidrogenasas y las NiFe-hidrogenasas. La presencia de estas enzimas depende del tipo de microorganismo utilizado y el proceso empleado para la producción de hidrógeno (Hallenbeck y Benemann, 2002).

Las NiFe-hidrogenasas tienden a estar asociadas con la oxidación de hidrógeno (Frey, 2002). Estas son las más numerosas y las más estudiadas en el dominio de las bacterias. Son enzimas unidas a la membrana, lo cual permite a las células utilizar el hidrógeno como fuente de energía (Vignais y Colbeau, 2004), provienen de bacterias aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas.

La FeFe-hidrogenasa se ha encontrado en procariontes anaerobias como las *Clostridium* y las sulfato reductoras. Estas enzimas se encuentran ubicadas en el periplasma de las bacterias anaerobias estrictas y son las principales responsables de la producción de hidrógeno. Las FeFe-hidrogenasas son extremadamente sensibles ante la presencia de oxígeno, es por esto que en un sistema es

imperativo que se cuide la cantidad de oxígeno disponible ya que afecta a la producción de hidrógeno.

1.6. Microorganismos relacionados con la producción de hidrógeno

La producción fermentativa de hidrógeno a partir de azúcares simples se puede realizar con la ayuda de bacterias fermentadoras por medio de tres rutas metabólicas: fermentación ácido mixta, fermentación butanodiólica y fermentación butírica (White, 2007; Caldwell, 1995; Gottschalk, 1986). Durante una fermentación acidogénica se llevan a cabo diferentes procesos de fermentación, esto se debe a la sucesión de diferentes poblaciones microbianas debido a las diferentes condiciones a las cuales está sujeto el inóculo, es por esto que se realizan diferentes tipos de fermentación. (Li y col., 2009).

1.6.1. Fermentación ácido mixta

La figura 3 representa la vía de la fermentación ácido mixta la cual es un tipo de fermentación heterofermentativa, es decir que produce más de un producto. Usualmente se lleva a cabo por miembros de la familia *Enterobacter*, incluyendo *Escherichia coli*, especies de *Proteus*, *Salmonella* y *Shigella*. En la vía ácido mixta se forman ácidos acético, láctico, succínico y fórmico en diferentes proporciones que varían con el microorganismo y las condiciones de cultivo a partir de azúcares; formando además etanol, dióxido de carbono e hidrógeno. La ruta de la fermentación acido-mixta en los microorganismos de lento crecimiento se da bajo concentraciones bajas de azúcar (Garrigues, 1997).

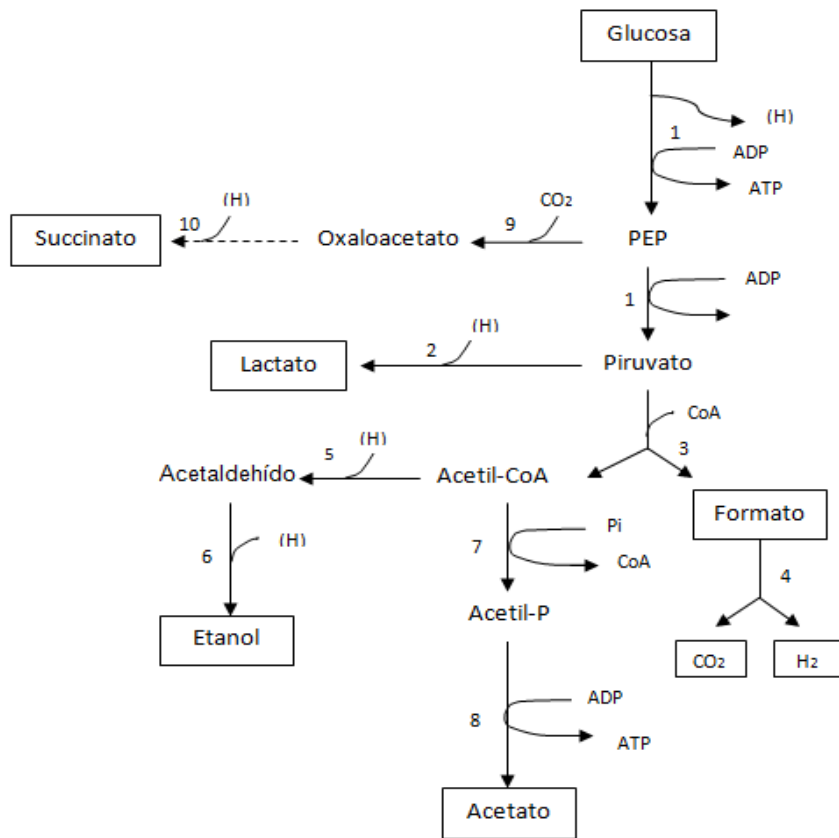


Figura 3. Enzimas involucradas en la Fermentación Mixta. 1. Enzimas para la ruta Embden-Meyehof-Parnas; 2. lactato deshidrogenasa; 3. piruvato formato liasa; 4. liasa formato-hidrógeno; 5. acetaldehído deshidrogenasa; 6. alcohol deshidrogenasa; 7. fosfotransacetilasa; 8. acetato cinasa; 9. PEP carboxilasa; 10, malato deshidrogenasa, fumarasa, fumarato reductasa.
Fuente: Gottschalk, 1986

1.6.2. Fermentación butanodiólica

La fermentación butanodiólica (figura 4) es otro ejemplo de heterofermentación llevada a cabo por ciertos miembros de la familia *Enterobacter* y *Serratia*. La glucosa se fermenta con la formación de 2,3 butanodiol, lactato, etanol, dióxido de carbono e hidrógeno, además de producir cantidades traza de los productos formados en la vía ácido mixta.

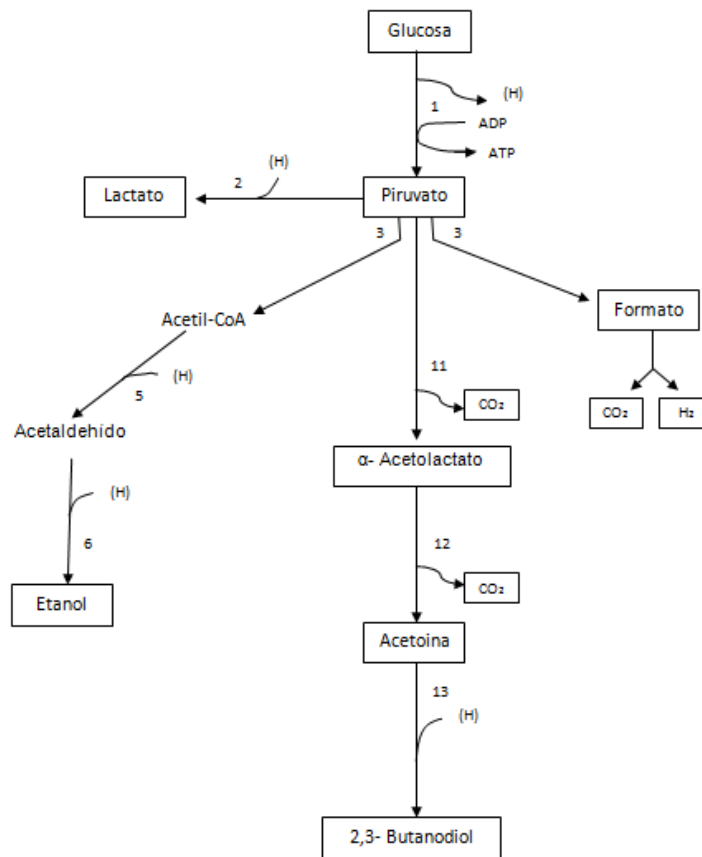


Figura 4. Enzimas involucradas en la fermentación butanodiólica. 1. Enzimas para la ruta Embden-Meyerhof-Parnas; 2. Lactato deshidrogenasa; 3. Piruvato formato liasa; 4. Liasa formato-hidrógeno; 5. Acetaldehído deshidrogenasa; 6. Alcohol deshidrogenasa; 11. α -acetolactato sintasa; 12. α -acetolactato descarboxilasa; 13. 2,3-butanodiol deshidrogenasa.

Fuente: Gottschalk, 1986

1.6.3 Fermentación butírica

En la figura 5 ilustra este tipo de fermentación la cual se realiza por ciertas especies de *Clostridium* como *Clostridium Acetobutylicum*, *Butyvirbio fibrisolvens*, *Eubacterium limosum*, *Fusibacterium nucleatum* en la que la glucosa se fermenta con la formación de ácido butírico, dióxido de carbono, hidrógeno y pequeñas cantidades de acetato.

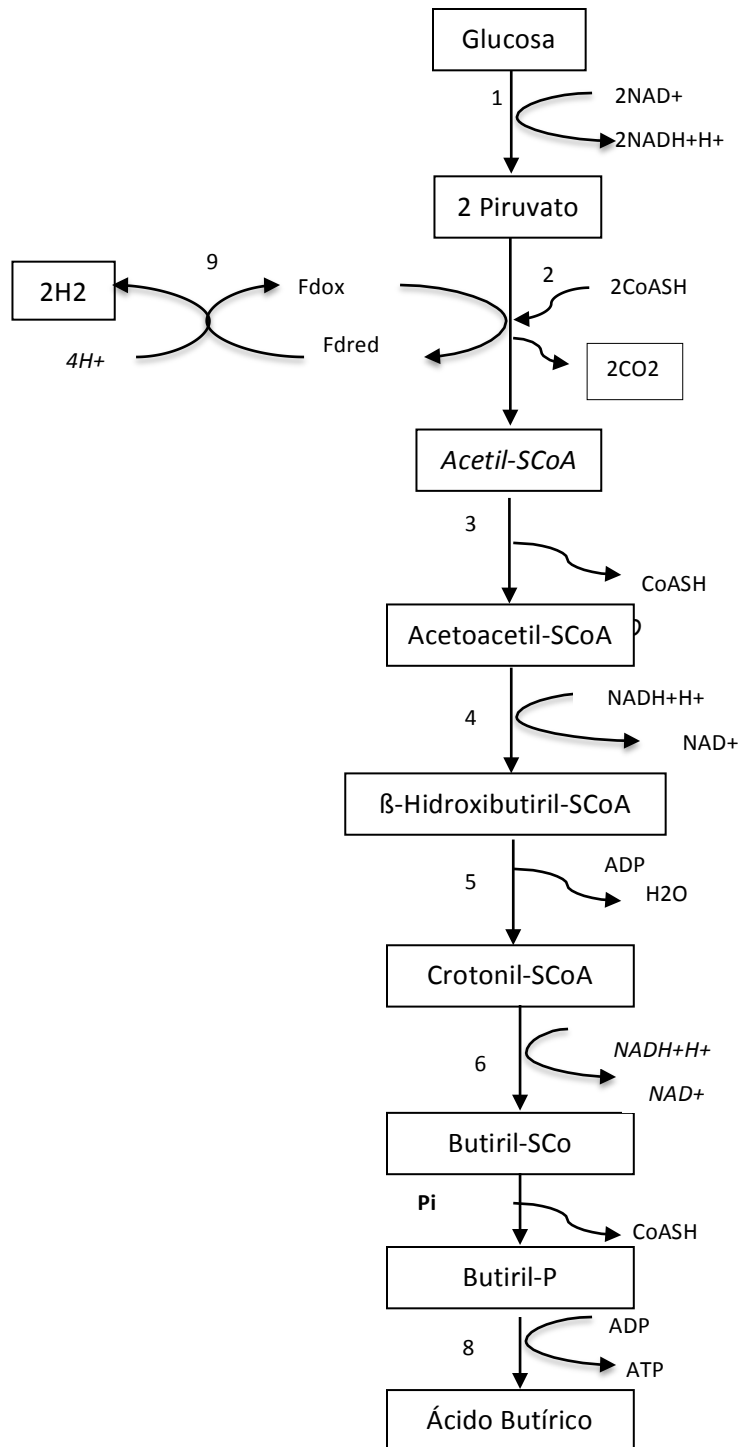


Figura 5. Enzimas involucradas en la Fermentación butírica. 1. Enzimas para la ruta Embden-Meyehof-Parnas; 2. Piruvato-ferredoxina oxidoreductasa; 3. Acetil-CoA acetiltransferasa (tiolasa); 4. β -hidroxi butiril-CoA dehidrogenasa; 5. Crotonasa; 6, butiril-CoA dehidrogenasa; 7. Fosfotransbutirilasa; 8. Butirato cinasa; 9. Hidrogenasa.

Fuente: White, 2007

1.7. Factores que afectan la producción de hidrógeno por fermentación oscura

El proceso de fermentación oscura para la producción de hidrógeno está influenciado por diversos factores tales como el tipo de inóculo, la temperatura, el pH, los sustratos utilizados y el tipo de reactor empleado (Wang y Wan, 2009). A continuación, se describe la importancia de dichas variables sobre la producción de hidrógeno.

1.7.1. Sustrato

Se ha reportado que el tipo de sustrato y su concentración son variables importantes para la producción de hidrógeno (Cubillos y col., 2009). Kapdan y Kargi 2006, mencionan que los sustratos preferidos para la producción de hidrógeno son los azúcares simples como la glucosa, la sacarosa y la xilosa.

1.7.2. Temperatura

La temperatura es uno de los factores que influyen fuertemente en la actividad de las bacterias productoras de hidrógeno, ya que afecta su crecimiento durante el arranque del reactor (Van y col., 2004). Esto se debe a que mientras la temperatura se eleva, la velocidad de crecimiento incrementa debido al aumento de la velocidad de las reacciones químicas y enzimáticas en las células (Koskinen, 2008). Carvajal, 2010, indica que bajo condiciones mesofílicas (35 °C) la velocidad específica de producción de hidrógeno es más alta que en condiciones termofílicas recomendando trabajar bajo estas temperaturas. Smolinski y Howaniec, 2009, reportaron que a 35 °C existe una producción óptima de hidrógeno debido a que a esta temperatura el sitio catalítico de la enzima se activa mejor.

1.7.3. pH

El pH influye en la actividad de la enzima hidrogenasa así como en la ruta metabólica de las bacterias presentes en el inóculo. El pH afecta directamente la actividad de la hidrogenasa ya que diferentes ambientes de pH ocasionan un cambio estructural en las enzimas así como un cambio en la tasa de reacción (Skidmore, 2010).

El valor inicial del pH de un sustrato es importante para la producción de hidrógeno ya que afecta su producción (Wang y Wan, 2009). Lo anterior se debe a que la generación de comunidades microbianas específicas depende del pH inicial del medio para la selección de los microorganismos. Kim y col., 2004 indican que el pH es el parámetro más importante a considerar pues de él depende la inhibición de la actividad de las arqueas metanogénicas y recomiendan el empleo de un valor de pH de alrededor de 5 para prevenir la acumulación de propionato, el cual es responsable de una baja producción de hidrógeno.

Fang y Liu, 2002, reportaron los efectos del pH sobre la composición del biogás en un reactor continuo; a un pH de 4 obtuvieron un contenido de hidrógeno en el biogás del 40 ± 2 %, mientras que a un pH 5.5 se obtuvo un contenido de hidrógeno en el biogás del 64 ± 2 %.

En otro estudio como el realizado por Herbert y Liu, 2002, se encontró que al utilizar glucosa como sustrato, con un cultivo mixto a 36 °C, el pH óptimo es de 5.5 obteniendo un rendimiento de 2.1 ± 0.1 mol H_2 /mol glucosa sin presencia de metano en el biogás debido a la supresión de actividad metanogénica bajo condiciones ácidas.

1.7.4. Tipos de inóculo

Se han realizado diversos estudios de la producción de hidrógeno con ayuda de cultivos puros y cultivos mixtos. Los principales cultivos puros utilizados para la producción de hidrógeno son: *Clostridium*, *Bacillus* y *Enterobacter* (Manikkanda y col., 2009). El problema de los cultivos puros es que en presencia de oxígeno la enzima productora de hidrógeno, la hidrogenasa, se inhibe pues es muy sensible a éste, lo cual provoca una reducción en la producción de hidrógeno y puede llegar a detener su producción.

Las bacterias anaerobias estrictas son especialmente sensibles al oxígeno debido a que carecen de 2 enzimas: dismutasa superóxido y catalasa que están presentes

en bacterias aerobias o aerotolerantes. Al no contener dismutasa superóxido, las bacterias anaerobias estrictas acumulan radicales superóxido que son altamente tóxicos. Este es el caso de las bacterias del género *Clostridium*, las cuales pueden generar hidrógeno como producto final, no obstante, se debe tener en cuenta que la presencia de oxígeno para éste grupo de bacterias puede resultar en su sensibilización inhibiendo su actividad, sin llegar a causar su muerte debido a que están protegidas por endosporos contra el efecto letal del oxígeno (White, 2007).

Los endosporos son paquetes de ADN y otras moléculas que pueden permanecer en estado latente por muchos años, resultando altamente resistentes al calor y a los productos quimiotóxicos, entre otros, los cuales ocasionan la muerte de las células reactivándose bajo condiciones favorables (Carrillo, 2003).

Se han empleado cultivos mixtos para obtener inóculos productores de hidrógeno; sin embargo, la principal desventaja es la presencia de microorganismos consumidores de hidrógeno. Para ello se han aplicado diversos pretratamientos con la finalidad de que las bacterias hidrógenogénicas sean las que permanezcan en el cultivo, ya que éstas, bajo condiciones extremas son capaces de formar endosporos para así poder sobrevivir y activarse bajo condiciones óptimas.

Se han evaluado diferentes tipos de pretratamientos entre los que se encuentra la aplicación de ácidos y bases fuertes, choque térmico, aplicación de sustancias químicas como el cloroformo, entre otros. Se ha observado un incremento en la producción de hidrógeno después de haber aplicado algún pretratamiento al inóculo empleado, lo cual se debió principalmente a la inactivación de los microorganismos consumidores de hidrógeno (Guo y col., 2007; Wang y Wan, 2008; Ren y col., 2008). Por otra parte, se ha encontrado que el empleo de pH bajo y/o TRH cortos pueden reducir la supervivencia de las bacterias no productoras de hidrógeno (Hung y col., 2011).

El uso de los distintos pretratamientos no es muy viable si se quiere producir hidrógeno a gran escala ya que sería muy costoso y no sería rentable, además de que si se realiza un pretratamiento de forma incorrecta se puede afectar a las bacterias productoras de hidrógeno (Wang y Wan, 2008). Dado que una de las metas en la producción de hidrógeno es la reducción de los costos de producción, resulta necesario analizar la posibilidad de producirlo sin necesidad de aplicar algún tratamiento previo al inóculo; sin embargo, se cuenta con poca información sobre la producción de hidrógeno empleando consorcios bacterianos sin que se les haya aplicado alguna clase de tratamiento previo.

1.7.4.1. Retención de la biomasa en el reactor por medio de gránulos

Se ha indicado que la retención de la biomasa en los reactores es una alternativa promisoría en los sistemas de operación en continuo pues son capaces de mantener concentraciones de biomasa altas y pueden operar a tasas de dilución más altas sin que se lave la biomasa (Zhang y col., 2008). Para superar el lavado de biomasa en los reactores de hidrógeno, es necesario disociar el tiempo de retención de sólidos del tiempo de retención hidráulica, lo cual se ha logrado principalmente mediante el uso de biopelículas en varios medios, incluyendo medios sintéticos, lodos granulares anaerobios, carbón activado, arcilla expandida, esponja, perlas de vidrio y el uso de membranas (Hafez y col., 2009).

La formación del lodo anaerobio granular puede ser considerada como la principal razón de la exitosa introducción de los reactores UASB para el tratamiento anaeróbico de efluentes industriales (Hulshoff y col., 2004). Existen diversas teorías acerca de la formación de los gránulos; sin embargo, la mayoría se centra en que estos se forman a partir de agregados de bacterias metanogénicas las cuales sirven como soporte para que otras bacterias se unan a ellas formando diferentes capas de bacterias que viven en consorcio.

La teoría de capas múltiples establece que las bacterias metanogénicas *Methanosaeta* forman agregados que van a ser el centro del gránulo (figura 6),

posteriormente las bacterias productoras y consumidoras de hidrógeno formarán la segunda capa y serán estas quienes alimenten a las bacterias del centro. Finalmente en la capa exterior del gránulo se establecerán las bacterias metanogénicas acetotróficas cuyos productos alimentarán a las bacterias de la segunda capa. (Hulshoff y col, 2004)

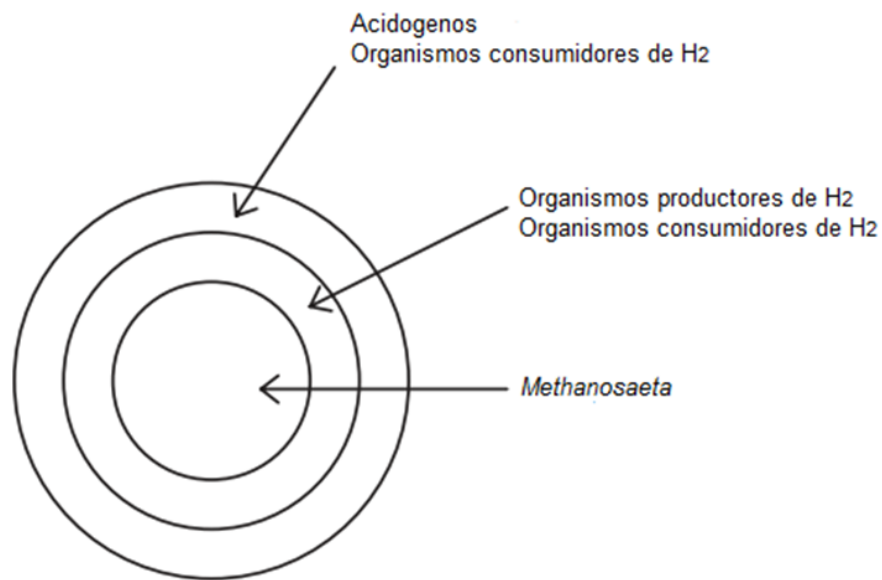


Figura 6. Composición de un gránulo de acuerdo a la teoría de capas múltiples.
Fuente: Hulshoff y col, 2004

Debido a la composición de los gránulos metanogénicos, en los cuales conviven de manera sintrófica microorganismos productores y consumidores de hidrógeno, es posible emplearlos como fuente de inóculo para la producción de hidrógeno. Sin embargo, el empleo de gránulos productores de hidrógeno tiene como principal desventaja el largo periodo de obtención de los mismos, el cual se ha reportado que va desde 60 hasta 230 días.

1.7.5. Tipos de reactores utilizados para la producción de hidrógeno

La búsqueda para producir hidrógeno eficientemente ha llevado a que se utilicen diferentes tipos de reactores como el reactor de flujo ascendente, el reactor continuo de tanque agitado (CSTR por sus siglas en inglés), el reactor discontinuo

secuencial (SBR por sus siglas en inglés), el reactor con membranas, entre otros. Estos reactores son importantes debido a que son efectivos para retener a la biomasa en la producción de hidrógeno.

Los reactores anaerobios de lecho con flujo ascendente (UASB, por sus siglas en inglés) han mostrado ser altamente efectivos para el tratamiento de efluentes industriales, en estos reactores el lodo se aglutina formando gránulos resultando en un incremento en la concentración de la biomasa, reduciendo el lavado del lodo, asimismo la formación de gránulos facilita las interacciones sintrófica entre los microorganismos involucrados en la degradación metanogénica de contaminantes orgánicos (Liu y Fang, 2009). Una desventaja que presentan los reactores UASB es la lentitud con la que se forman gránulos de alta sedimentabilidad y actividad metanogénica. Esto presenta gran importancia durante el arranque de los reactores ya que con un inóculo granular adecuado se pueden acortar los periodos de puesta en marcha (Hernández, 2005).

En cuanto a la operación, los reactores en continuo han sido los más estudiados para la producción de bio-hidrógeno debido a que facilita la transferencia de masa. Dentro de estos reactores las bacterias productoras de bio-hidrógeno se encuentran suspendidas en el licor mezclado lo cual facilita que a TRH bajos las bacterias consumidoras de hidrógeno sean lavadas evitando así la producción de metano. A escala industrial los reactores operados en forma continua han mostrado ser más convenientes debido a su fácil manejo (Wang y Wan, 2008). Sin embargo, el costo inicial para los reactores en continuo es muy alto y el empleo de TRH bajos puede llegar a provocar el lavado de la biomasa y desestabilizar el proceso.

Por el contrario un reactor biológico secuencial tiene un costo inicial más bajo y al igual que los reactores continuos los microorganismos son retenidos por un periodo de inmovilización. (Bedoya y col., 2007). Los reactores anaerobios discontinuos secuenciales funcionan bajo cuatro etapas bien definidas, las cuales son:

alimentación, reacción, sedimentación y vaciado. Este tipo de reactores se han estudiado como una alternativa de tratamiento a los sistemas continuos debido a la versatilidad de su operación. Algunas de sus ventajas son:

1. Adaptación de operación a diferentes sistemas de alimentación.
2. Permite tratar compuestos de difícil degradación y/o tóxicos.
3. Presenta gran efectividad de remoción de materia orgánica con una alta actividad metanogénica.

1.8. Arranque del reactor productor de bio-hidrógeno

El arranque de reactor tiene fuertes implicaciones en el sistema debido a que tiene una gran influencia sobre la producción de hidrógeno y el tipo de microorganismos que se desarrollarán dentro del mismo. Lin y col., 2010 operaron un reactor en lote durante el arranque por dos días utilizando sacarosa como sustrato, donde se mostró que operar un reactor en lote reducía eficientemente la fase de adaptación e incrementaba el crecimiento de la biomasa.

En la mayoría de los estudios realizados para la obtención de bio-hidrógeno se utiliza un inóculo con un tratamiento previo para la selección de los microorganismos formadores de esporas y eliminar a las arqueas metanogénicas. En un estudio realizado por Ren y col., 2008, donde se utilizaron inóculos diferentes con pretratamiento y un inóculo control sin ningún pretratamiento, se comenzó a obtener biohidrógeno a las 27 h aproximadamente con presencia de metano. Asimismo, Mohan y col., 2007, realizaron diferentes pretratamientos con un control para la obtención de un inóculo productor de biohidrógeno donde se detectó la presencia de biohidrógeno a las 10 h.

Hawks y col., 2007, recomiendan usar un reactor en lote al inicio cuando se utiliza un inóculo con pretratamiento antes de cambiar la operación del reactor a continua para evitar el lavado del inóculo. Asimismo, indican que es importante evitar la esporulación durante la operación de un reactor en continuo debido a la exposición

al oxígeno, estrés por falta de nutrientes y alimento, ya que se pueden propiciar condiciones para el crecimiento de bacterias no productoras de hidrógeno.

Se han realizado pocas investigaciones en la producción de hidrógeno para un arranque de reactor utilizando un inóculo sin pretratamiento. Algunos estudios realizados utilizando esta condición controlan condiciones específicas como el TRH y el pH para controlar y evitar el crecimiento de microorganismos no productores de bio-hidrógeno (Fang y col., 2002; Fang y col., 2002; Nakamura y col., 1993; Lin y col., 2003; Yu y col., 2007). Sin embargo, no se ha podido inhibir completamente la actividad de las bacterias consumidoras de hidrógeno, como las arqueas metanogénicas, debido a que son capaces de aclimatarse a las condiciones de operación del reactor.

Uno de los estudios con inóculo sin pretratamiento es el realizado por Shizas y Bagley, 2005, donde se arranco el reactor en lote a un pH de 6.0 ± 0.02 con una alimentación de $0.5 \text{ kg de glucosa/m}^3/\text{d}$ para la aclimatación del inóculo. El reactor se operó de esta manera durante 1 mes que fue cuando el pH del reactor cayó a 5.5 ± 0.02 y la operación del reactor se cambio a un CTSR con un TRH de 10 h y una alimentación de 4 g/L de glucosa. Posteriormente el reactor fue operado en tres etapas; la primera y la tercera sin inyectar gas nitrógeno y la segunda inyectándolo. Esto se hizo con el fin de disminuir la concentración de hidrógeno disuelto en el reactor llevando la fermentación de glucosa hacia acetato e hidrógeno. Se observó que durante la segunda etapa al purgar, se incrementó el porcentaje de gas hidrógeno de 45-50 % a un 20 % más después de la purga y no se detecta presencia de metano. Asimismo en la tercera fase al no purgar, se observó una disminución en el porcentaje de hidrógeno (20-30 %) y se detecta la presencia de metano; esto se debe a la presencia de organismos hidrógenotróficos en el sistema que lograron desarrollarse.

Por otro lado, se ha utilizado una combinación de operación del reactor en lote y en continuo con el fin de aprovechar las ventajas de ambas operaciones. Tal es el

caso de Hussy y col., 2005, quienes experimentaron arrancando un reactor en lote logrando estabilizar la producción de bio-hidrógeno, cambiando posteriormente a una operación en continuo, obteniendo como subproducto principalmente butirato. La producción de bio-hidrógeno comenzó después de dos días y medio con una producción de hidrógeno que incremento de 0.1 a 3 mL/min y un contenido de 60-70 % hidrógeno. Al estabilizarse la producción de bio-hidrógeno, se cambió el modo de operación del reactor a una operación en continuo. Esta producción de bio-hidrógeno se redujo entre los 7 y 9 días perdiendo producción de bio-hidrógeno.

Kim y col., 2008, observaron un decremento drástico de producción de hidrógeno cuando cambiaron la operación del reactor de lote a continuo al haber alcanzado un rendimiento de hidrógeno de 0.5 mol H₂/mol hexosa. Esto lo adjudicaron a los efectos competitivos e inhibitorios de las bacterias productoras de ácido propiónico sobre las bacterias productoras de hidrógeno, lo cual se atribuyó a que largos periodos de tiempo de retención hidráulica pueden causar arranques de reactor no deseados pues se le puede proveer suficiente tiempo a ciertas bacterias perjudiciales para el sistema, como las bacterias ácido lácticas y las bacterias productoras de ácido propiónico, las cuales se pueden propagar; sin embargo, para los microorganismos como los del genero Clostridium el encontrarse en una operación por lote corta, puede causar su disminución en el reactor. En otro experimento, se cambió la operación del reactor de lote a continuo cuando el rendimiento de hidrógeno fue de 0.2 mol H₂/mol hexosa. Esto dió como resultado una producción baja de ácido propiónico, ya que un cambio de operación rápido, de lote a continuo, ayuda a la supresión de las bacterias productoras de ácido propiónico.

Jung y col., 2010, plantean la utilización de un reactor en continuo durante los primeros 7 días para la aclimatación del inóculo y después se cambia a un reactor de flujo ascendente. Esto es debido a que la principal desventaja de los reactores de flujo ascendente es que requieren de periodos muy largos para la aclimatización

del inóculo y esto provoca que microorganismos no deseados se desarrollen en el sistema.

Así, en el presente trabajo se propone el empleo de lodo granular metanogénico, para llevar a cabo la adaptación de la comunidad productora de hidrógeno. Asimismo este estudio aporta datos importantes al no darle un tratamiento al lodo, ya que la mayoría de los estudios se realizan dando una preselección para la producción de un lodo productor de hidrógeno, no resultando viable a gran escala como ya se había mencionado en este trabajo.

2. HIPÓTESIS

Al aplicar un pH bajo y tiempos de retención hidráulicos cortos será posible obtener un inóculo productor de bio-hidrógeno empleando lodo anaerobio granular metanogénico sin tratamiento previo.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Evaluar el efecto del modo de operación del reactor puesta en marcha para la obtención de un inóculo productor de bio-hidrógeno a partir de lodo anaerobio granular que permita suprimir tanto como sea posible la actividad metanogénica del inóculo empleado sin la necesidad de aplicar algún tratamiento previo. La presión de selección de las bacterias productoras de hidrógeno estará dada por el uso de pH bajo y tiempos de retención cortos.

3.2. Específicos

1. Evaluar el desempeño del inóculo para la producción de hidrógeno bajo una estrategia de arranque discontinua secuencial.
2. Evaluar el desempeño del inóculo para la producción de hidrógeno bajo una estrategia de arranque en continuo.

4. METODOLOGÍA

4.1. Inóculo

Se utilizaron gránulos anaerobios provenientes de un reactor UASB que trata las aguas residuales de una industria cervecera. El inóculo se lavó con agua corriente para eliminar arena y basura. El lodo se cribó mediante un tamiz del número 2, lo cual permitió obtener gránulos de un diámetro promedio de 2.0 ± 0.2 mm. Este inóculo presentó una velocidad de sedimentación de 2.2 ± 0.4 cm/s y una densidad de 1.012 kg/L.

4.2. Sustrato

Para la alimentación del reactor se utilizó glucosa como única fuente de carbono en una solución mineral con nutrientes de acuerdo a lo establecido por Mizuno y col., 2000. Se prepararon 3 soluciones minerales con agua desionizada donde la solución 1 contenía 10 g/L de K_2HPO_4 ; la solución 2 contenía 104 g/L de NH_4Cl , 0.1 g/L de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 5 g/L de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y la solución 3 contenía 1 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.9 g/L de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.5 g/L de KI, 0.1 g/L de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.1 g/L de H_3BO_4 , 0.1 g/L de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ y 0.1 g/L de $ZnCl_2$. Por litro de alimentación se agregó 25 mL de la solución 1, 25 mL de la solución 2 y 5 mL de la solución 3.

4.3. Procedimiento experimental

Se probaron dos estrategias para la producción de bio-hidrógeno con lo cual se establecieron dos modos de operación: como un reactor discontinuo secuencial (SBR) y como un reactor en continuo (UASB) para determinar el mejor método de arranque del reactor.

El material de los reactores utilizados a escala laboratorio fue de acrílico y ambos reactores se inocularon con 7.3 ± 0.4 g-SSV/L. Se alimentaron 5 g/L*d de glucosa. Los reactores fueron provistos con una banda térmica y un controlador que mantuvo la temperatura a 35 °C, un controlador de pH (Hanna BL 981411) el cual utilizaba una bomba dosificadora para ajustar el pH al valor requerido mediante la

dosificación de base (1N NaOH) y bombas para la alimentación, recirculación y descarga del reactor.

El biogás producido se midió con un totalizador de gas por desplazamiento de columna de agua (Prendo, México). Antes de arrancar ambos reactores, fueron purgados con nitrógeno para proporcionar un ambiente anaerobio.

4.3.1. Operación del reactor anaerobio discontinuo secuencial

Se utilizó un reactor SBR con un volumen útil de 1.0 L. Se mantuvo un pH de 5.5 ± 0.1 . El TRH se redujo gradualmente de 24 a 12 y 6 horas. Las etapas y tiempos de operación del reactor fueron las siguientes: alimentación (2 min), reacción (variable en función del TRH aplicado), sedimentación (2 min), vaciado (3 minutos) y tiempo muerto (2 minutos).

4.3.2. Operación del reactor en continuo

Se utilizó un reactor UASB con un volumen de operación de 2 L. Debido a la aclimatación de los micrororganismos consumidores de hidrógeno al pH empleado en la estrategia anterior, se redujo el pH a 4.5 ± 0.1 . El tiempo de retención hidráulica se fijó a 5.5 horas.

4.4. Técnicas analíticas

Para dar seguimiento a los procesos que llevaron a la obtención de un inóculo productor de hidrógeno, se realizaron diferentes técnicas analíticas presentadas a continuación.

4.4.1. Determinación del consumo de glucosa

Para la determinación de la concentración de glucosa se utilizó el método de fenol-acido sulfúrico descrito por Dubois y col., 1956, el cual se fundamenta en que los carbohidratos son particularmente sensibles a los ácidos fuertes y a las altas temperaturas. Bajo estas condiciones, una serie de reacciones complejas toman lugar empezando con una deshidratación simple, si se continua el calentamiento y

la catálisis acida se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos coloridos producto de la condensación de los compuestos fenólicos y heterocíclicos con el nitrógeno como heteroátomo.

4.4.2. Caracterización del biogás

Para la caracterización del biogás se tomó una muestra de 10 mL en la cabeza del reactor y se inyectó en un cromatógrafo de gas (SRI 8610C) equipado con un detector de conductividad térmica y dos columnas empacadas (una columna de 6' x 1/8" de sílica gel empacada en acero inoxidable y una columna de 6' x 1/8" de corte molecular 13X empacada en acero inoxidable). La temperatura del inyector y del detector fue de 90 °C y 150 °C, respectivamente. La temperatura de la columna varió de la siguiente manera: se inicio con una temperatura de 40 °C mantenida durante 4 min y después incremento gradualmente de 40°C a 110°C a una tasa de 20 °C/min, donde la temperatura final se mantuvo durante 3 min. Se utilizó N₂ como gas acarreador a un flujo de 20 mL/min. El cromatógrafo determina hidrógeno, metano, dióxido de carbono y monóxido de carbono en la misma muestra.

4.4.3. Ácidos grasos volátiles

La determinación cuantitativa de los ácidos grasos volátiles y etanol en el efluente se realizó con un cromatógrafo de gases (Varian 3300) equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar (Agilent con un diámetro interno de 0.530 mm y una longitud de 15 m). La temperatura del inyector y del detector fue de 190 °C y 210 °C, respectivamente. La temperatura de la columna varió de la siguiente manera: la temperatura inicial fue de 70 °C y gradualmente incrementó de 70 °C a 130 °C a una tasa de 10 °C/min, la temperatura final se mantuvo por 7.5 min. Se utilizó N₂ como gas acarreador a una presión de 482 kPa. El tiempo de corrida fue de 13 min. Las muestras para este análisis se centrifugaron y se acidificaron a un pH de 2, se colocaron en viales de 2.5 mL y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

4.4.4. Cuantificación de sólidos suspendidos totales, fijos y volátiles

La determinación de los sólidos suspendidos totales, fijos y volátiles se realizó por métodos gravimétricos estandarizados (APHA, 1992).

4.4.5. Morfología de los gránulos

La morfología de los gránulos se observó mediante un estereoscópio acoplado a una regla. Con esto fue posible darle seguimiento al cambio de diámetro y de color de los gránulos en ambas estrategias.

5. RESULTADOS

5.1. Efecto del TRH sobre la morfología de los gránulos

5.1.1. Puesta en marcha en discontinuo

Al comienzo del experimento con el uso de la estrategia de arranque en discontinuo, el inóculo original presentó un diámetro de 2.0 ± 0.2 mm con un color negro brillante, geometría ovalada y una consistencia sólida como se muestra en la figura 7A. Durante la aclimatación para el arranque en discontinuo se evaluaron 3 TRH durante 22 días.

Al final del TRH de 24 h, figura 7B, el diámetro del inóculo se redujo a 1.9 ± 0.1 mm. Se observó que algunos de los gránulos comenzaron a tornarse de color gris y aunque conservaron su geometría original, algunos de ellos comenzaron a disgregarse. Posteriormente al final del TRH de 12 h, figura 7C, el diámetro del inóculo se redujo nuevamente a 1.7 ± 0.3 mm, el color de los gránulos cambió y algunos permanecieron de color gris mientras que otros se tornaron de color café, a pesar de que se siguieron disgregando algunos gránulos; sin embargo, este fenómeno se presentó con menor intensidad en comparación con lo observado durante el empleo del TRH anterior. Finalmente al término del experimento con un TRH de 6 h, figura 7D, el diámetro promedio de los gránulos fue de 1.6 ± 0.4 mm, la geometría de los gránulos se mantuvo ovalada y su coloración fue principalmente café aunque se continuó observando algunos gránulos de color gris.

La disminución del diámetro de los gránulos se debe al cambio y pérdida de la población microbiana que no pudo permanecer en estos debido a la presión de selección hidráulica ejercida por la operación del reactor. Este proceso de selección de la población microbiana se puede dar a conocer por medio de los subproductos obtenidos en el efluente del reactor, así como la composición del biogás obtenido durante su operación.

En el caso del biogás, cuando el inóculo presentaba arqueas metanogénicas, la concentración de metano en el biogás alcanzó un máximo de 57 %. Conforme se

redujo el TRH (de 24 a 6 horas) el contenido de metano en el biogás disminuyó hasta un nivel del 13 %, promedio, lo cual se pudo deber a que este corto TRH afectó el metabolismo de los microorganismos metanogénicos y se favoreció la actividad de bacterias hidrogenogénicas.

El cambio de color se debió principalmente a la supresión de la actividad sulfato reductora de los microorganismos presentes en los gránulos empleados puesto que a un pH menor a 6.0 la actividad sulfato reductora se suprime y se observa un cambio de color en la biomasa (Fang y col., 2002).

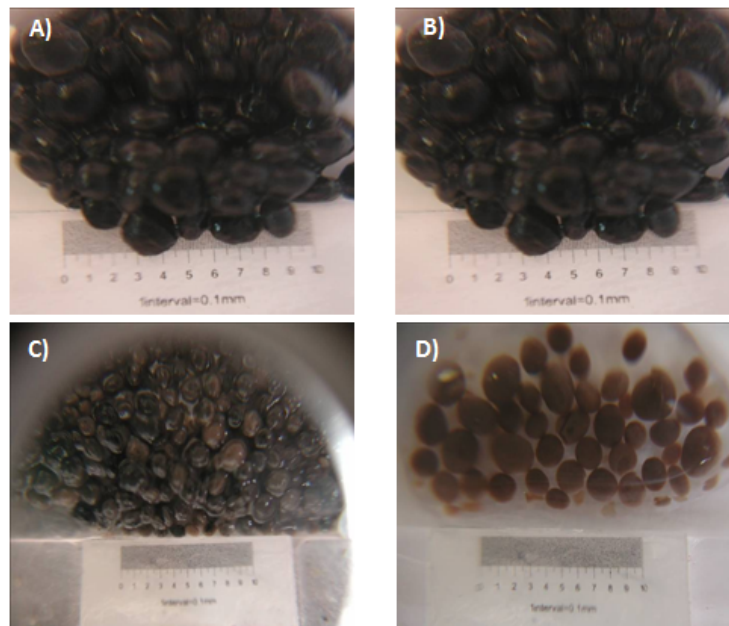


Figura 7. Efecto del TRH en la morfología de los gránulos: A) inóculo al principio del experimento, B) inóculo al final del TRH de 24 h, C) inóculo al final del TRH de 12 h, D) inóculo al final del TRH de 6 h.

Por otro lado se observaron gránulos rotos tal como lo mencionan Fang y col., 2002, quienes generaron gránulos productores de hidrógeno los cuales cambiaron de un color negro a un color blanquecino como lo descrito en este trabajo, además de presentar fisuras. Ellos mencionan que la causa de estas fisuras en los gránulos se deben a la salida del biogás generado por el metabolismo de estos, facilitando la obtención de alimento a los microorganismos localizados en el centro de los

gránulos (arqueas metanogénicas), presentando una apariencia menos firme y sólida.

5.1.2. Puesta en marcha en continuo

Al comienzo del experimento con el uso de la estrategia de arranque en continuo, el inóculo original presentó un diámetro de 2.0 ± 0.2 mm con una geometría ovalada y una consistencia sólida de color negro brillante. La aclimatación durante el arranque en continuo se llevó a cabo durante 17 días. Conforme se fue operando el reactor se observó cómo los gránulos comenzaron a cambiar de color adquiriendo un color grisáceo en algunas zonas de los gránulos con una morfología homogénea a diferencia del comportamiento de los gránulos en la estrategia de arranque en discontinuo. Posteriormente cuando se comenzó a incrementar la producción de bio-hidrógeno, los gránulos comenzaron a tornarse de un color café claro. Finalmente se midió el diámetro de los gránulos el cual fue de 1.3 ± 0.3 mm, la geometría de los gránulos se mantuvo ovalada y su coloración aproximadamente a partir del día 14 fue principalmente café claro (figura 8), donde la producción estaba dirigida a hidrógeno sin presencia detectable de metano. A pesar de la reducción del diámetro de los gránulos, el análisis estadístico (t-Student, $\alpha = 0.05$) indicó que no existe diferencia significativa entre el diámetro original de los gránulos y el diámetro final.

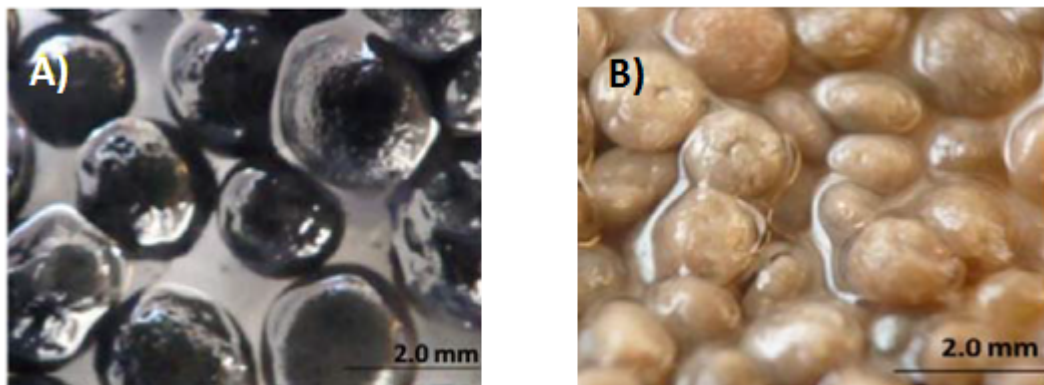


Figura 8. Efecto de la operación en continuo (estrategia 2) sobre la morfología de los gránulos. A) Gránulos anaerobios, B) Gránulos adaptados para la producción de hidrógeno.

Adicionalmente, a partir del día 20 se observó el desarrollo de una nueva biomasa dentro del reactor. Dicha biomasa presentó un color blanco con un crecimiento de tipo disperso; sin embargo, a partir del día 25 ésta biomasa comenzó a formar gránulos con un diámetro promedio de 1.0 ± 0.3 mm, con una consistencia muy blanda, los cuales se lavaron del sistema. Dos días después (día 27) se volvió a observar este proceso de granulación y lavado del sistema el cual se repitió hasta el final del experimento.

5.2. Desempeño del reactor para la producción de bio-hidrógeno

5.2.1. Puesta en marcha en discontinuo

En la figura 10 se observa la composición del gas durante la operación del reactor con la estrategia de arranque en discontinuo. La producción de bio-hidrógeno comenzó a partir de las primeras 24 h de operación con un alto contenido de CO_2 , posteriormente la composición de CO_2 disminuyó incrementando la producción de metano, la cual disminuyó drásticamente a las 120 h donde se obtuvo la máxima producción de hidrógeno (816 mL de H_2) con un TRH de 24 h y una composición de hidrógeno en el biogás de un 70 %.

Debido a que la producción de hidrógeno disminuyó fuertemente, se redujo el TRH a 12 h con el objetivo de ir seleccionando gradualmente la biomasa dentro del reactor, favoreciendo el desarrollo de las bacterias productoras de hidrógeno sobre aquellas que lo consumen. No obstante, debido a que se continuo observando la presencia de metano en el biogás, se redujo el TRH a 6 h.

Conforme se redujo el TRH de 24 a 6 horas el contenido de metano en el biogás también disminuyó obteniendo valores promedio de 32 ± 25 %, 18 ± 7 % y 13 ± 2 % para los TRH de 24, 12 y 6 horas, respectivamente.

A pesar de que la reducción del TRH resultó en la reducción en el contenido de metano en el biogás este siempre estuvo presente. Es decir, la actividad de las arqueas metanogénicas no se inhibió por completo. Aún más la concentración de

metano en el biogás se mantuvo estable a un TRH de 6 horas. Lo anterior se puede deber a que los microorganismos metanogénicos fueron capaces de aclimatarse a las condiciones de operación del reactor (Taconi y col., 2007; Zhou y Ren, 2007)

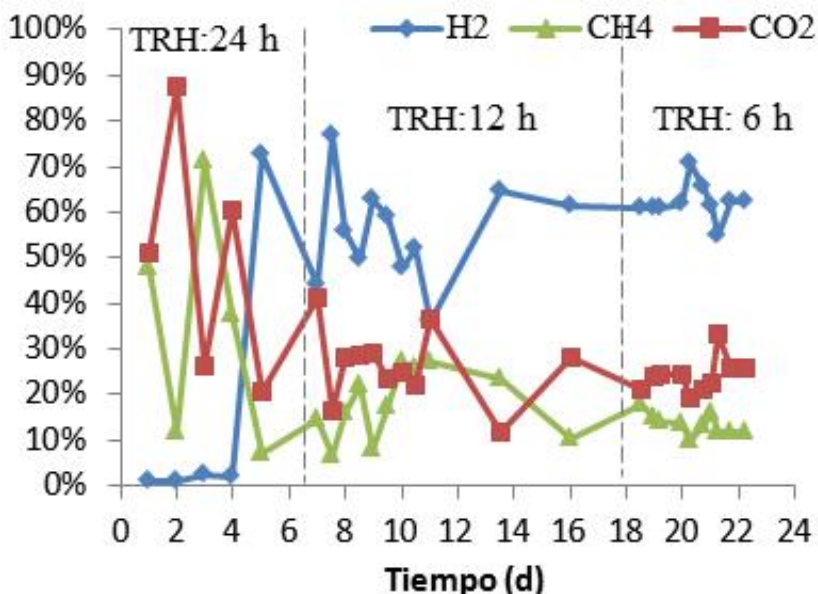


Figura 9. Composición del biogás producido durante la operación discontinua del reactor.

El rendimiento de la producción de hidrógeno se incrementó conforme se redujo el TRH. Los rendimientos observados fueron de 0.4, 0.8 y 1.4 mol H₂/mol Glucosa para los TRH de 24, 12 y 6 horas, respectivamente.

5.2.2 Puesta en marcha en continuo

Debido a que el objetivo de este trabajo consistía en obtener un inóculo productor de hidrógeno se decidió cambiar la forma de operación del reactor para evaluar su efecto en la adaptación del inóculo empleado. El reactor se inoculó nuevamente y se redujo el valor de pH, asimismo se empleó un TRH más corto (5.5 horas). El cambio del valor del pH se debe a que se ha reportado que el uso de este pH afecta a la tasa metabólica de los microorganismos metanogénicos (Zhou y Ren, 2007).

En la figura 10 se observa el porcentaje de biogás obtenido con la puesta en marcha en continuo. A los dos días de inicio del experimento la producción de biogás estaba dirigida principalmente hacia dióxido de carbono (75 %), una producción menor de metano (27 %) y una cantidad mínima de hidrógeno. A partir del día 3, la producción de hidrógeno comenzó a aumentar hasta el día 10 donde se mantuvo con poca variación de porcentaje de hidrógeno de entre un 65-75 % de hidrógeno en la composición del biogás.

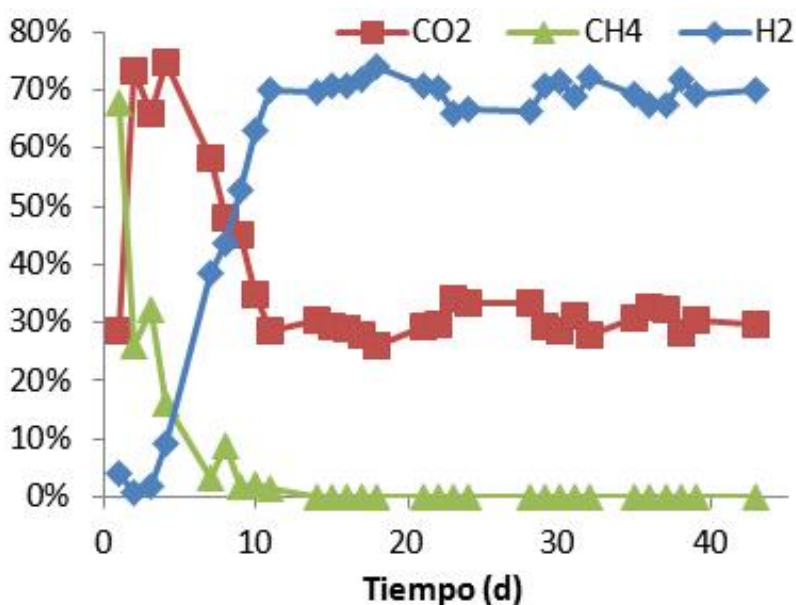


Figura 10. Composición del biogás producido durante la operación continua del reactor.

Desde el primer día del experimento se observó la presencia de metano en el biogás alcanzando una concentración máxima del 68 %, la cual tendió a disminuir conforme se fue operando el reactor. A partir del día 14 no se detectó la presencia de metano en el biogás. Esto indica que las condiciones de operación del reactor empleadas permitieron suprimir la actividad metanogénica del inóculo.

Debido a esto, se continuó con la operación del reactor hasta el día 40. El contenido de hidrógeno en el biogás se incrementó y se varió entre el 66 % y 77 %.

El rendimiento de la producción de hidrógeno en este periodo se mantuvo fue de 2.6 ± 0.2 mol H_2 /mol glucosa.

El rendimiento máximo obtenido fue de 3.2 mol de H_2 /mol de glucosa con un promedio de 2.6 ± 0.2 mol de H_2 /mol de glucosa, el cual es más alto que los reportados por varios autores como Wang y Wan, 2008 quienes utilizaron diferentes tipos de pretratamientos obteniendo rendimientos máximos de 1.78 mol de H_2 /mol de glucosa. Por otro lado Lin y col., 2008, obtuvieron 1.4 mol de H_2 /mol de xilosa; Akutsu y col., 2009 obtuvieron 1.68 mol de H_2 /mol de almidón; Ren y col., 2008 obtuvieron 1.96 mol de H_2 /mol de glucosa.

5.3 Subproductos obtenidos durante las estrategias de puesta en marcha empleadas

5.3.1 Puesta en marcha en discontinuo

Durante la estrategia de arranque en discontinuo (Cuadro 1), al principio del TRH de 24 h se obtuvo una alta producción de ácido propiónico, esto está ligado a la alta producción de metano y la baja producción de hidrógeno ya que las bacterias que predominaban en el reactor utilizaban el hidrógeno como sustrato; sin embargo, conforme se fue reduciendo el TRH la producción de ácido propiónico disminuyó y se incrementó la producción de ácido butírico y ácido acético siendo el ácido butírico el producto final predominante lo que indica que el tipo de fermentación que se llevó a cabo fue la fermentación butírica. La reducción de propiónico resulta similar en el estudio realizado por Lin y Chang, 2004, donde al reducir el TRH en su reactor a 6 h descendió significativamente la producción de propionato en el reactor. La reducción en la producción de ácido Propiónico se puede deber a la sensibilidad de las bacterias productoras de ácido Propiónico al uso de tiempos de retención hidráulica cortos (Zhang y col., 2006)

Cuadro 1. Subproductos obtenidos durante la puesta en marcha en discontinuo

TRH (h)	Etanol (mg-COD/L)	AC. Acético (mg-COD/L)	AC. Propiónico (mg-COD/L)	AC. Butírico (mg-COD/L)	AC. Valérico (mg-COD/L)
24	174±6	385±19	726±8	380±7	129±6
12	141±12	53±16	69±41	85±51	77±16
6	34±22	49±5	15±4	74±15	44±53

Asimismo, en la Cuadro 1 observamos la relación entre el ácido acético y el ácido butírico donde el acético se fue perdiendo conforme el butírico fue incrementando demostrándose la eficiencia del reactor. La pérdida de propionato en el reactor nos habla de un cambio en la población microbiana donde al reducir el TRH el crecimiento de las bacterias consumidoras de hidrógeno no tienen el suficiente tiempo para desarrollarse abriendo paso al desarrollo de las bacterias productoras de hidrógeno lo que demuestra un incremento de este en el biogás y la obtención de productos finales como el acetato y butirato (Canul, 2010).

La distribución final de los productos sugiere la presencia de bacterias del tipo *Clostridium* quienes son las responsables de fermentar azúcares obteniendo rendimientos altos resultando como subproductos finales butirato, acetato y otros productos de la fermentación (Turker y col., 2008). En el caso de propionato esto se debe a la presencia de una fermentación ácido láctica donde la presencia de este indica un consumo de hidrógeno, por ello al ir en incremento la producción de biohidrógeno la producción de propionato disminuía (Antonopoulou y col., 2006).

5.3.2 Puesta en marcha en continuo

Durante la estrategia de arranque en continuo, al igual que la estrategia de arranque en discontinuo, se obtuvo ácido propiónico al inicio del experimento (ver Cuadro 2). Por otro lado la producción de ácido acético era mayor a la de ácido propiónico, sin embargo, al día 18 la producción de ácido propiónico no se detectó y se incrementó la producción de ácido butírico siendo esta la que prevaleció hasta

el final del experimento. Lo anterior está relacionado con la selección de la biomasa en el reactor, ya que conforme fue disminuyendo la concentración de ácido propiónico la concentración de metano en el biogás fue disminuyendo hasta llegar a ser indetectable.

Cuadro 2. Subproductos obtenidos durante la puesta en marcha en continuo.

Día	Etanol (mg/L)	Ac. Acético (mg/L)	Ac. Propiónico (mg/L)	Ac. Butírico (mg/L)
1 a 17	22 ± 19	201 ± 145	118 ± 96	451 ± 311
18 a 43	33 ± 12	110 ± 81	0	262 ± 178

De acuerdo a la mayoría de los estudios realizados de fermentación acidogénica para la producción de hidrógeno, cuando se encuentra principalmente como subproductos el ácido butírico y el ácido acético, se lleva a cabo una fermentación butírica (Ren, y col., 2006; Riveiro y col., 2011).

6. DISCUSIÓN

La utilización de pretratamientos químicos o térmicos como herramienta para la obtención de inóculos productores de hidrógeno ha sido muy explorada; sin embargo, el llevar este método a escala real resulta limitativo y poco práctico. En este experimento los gránulos sin pretratamiento que se utilizaron para la producción de un inóculo productor de hidrógeno fueron capaces de producir hidrógeno en un menor tiempo que el reportado en la literatura.

Para poder producir hidrógeno de manera continua empleando un sistema biológico con el fin de atender a las demandas industriales de energía, tanto el rendimiento como la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno son variables de respuesta importantes al momento de evaluar el desempeño del sistema biológico.

Como se muestra en la Cuadro 3, la estrategia de arranque en discontinuo mostró ser más eficiente en cuanto a la velocidad volumétrica de producción pues fue casi tres veces mayor que la obtenida en la estrategia de arranque en continuo. Sin embargo, en la estrategia de arranque en continuo no se detectó presencia de metano cuantificable a partir del día 14 del experimento, lo cual no fue posible lograr con la estrategia de arranque en discontinuo.

Cuadro 3. Comparación de los resultados obtenidos con la estrategia de arranque en discontinuo y en continuo.

TRH	Vel. Producción (mL H ₂ -L-h)	Rendimiento (mol-H ₂ /mol-glucosa)
24	16	0.4
12	54	0.8
6	57	1.4
Adaptación en Continuo	72	2.6

La operación en continuo del reactor presento una velocidad de producción y un rendimiento mayor al obtenido con la operación en discontinuo a un TRH corto (6 horas). Además la operación en continuo permitió inhibir la actividad metanogénica del inóculo en 17 días lo cual no fue posible lograr con la operación en discontinuo. Durante la operación en discontinuo se obtuvo un rendimiento máximo de 1.4 mol H₂/mol glucosa a un TRH de 6 h el cual fue aproximadamente 50 % menor que el obtenido con la operación en continuo. En este sentido, otros estudios realizados con reactores en discontinuo han obtenido rendimientos mayores. Datar y col., 2006, reportaron un rendimiento máximo de 3 mol H₂ / mol glucosa cuando operaron un reactor en discontinuo inoculado con un lodo anaerobio con pretratamiento térmico. Asimismo Zhang y col., 2008 obtuvieron un rendimiento de 1.88 y 1.81 mol H₂/mol glucosa utilizando un inóculo de lodo suspendido y lodo granular respectivamente con pretratamiento en un CSTR a un pH de 5.5.

En este experimento se observó la presencia de etanol, propionato, butirato y acetato como subproductos de la producción de hidrógeno siendo los dos últimos los que determinan la ruta metabólica de la producción de hidrógeno y encontrándose en mayor cantidad. Las rutas metabólicas que se presentaron durante las dos estrategias de arranque propuestas concuerdan con lo reportado en la literatura para la producción de hidrógeno (Li y col., 2007).

Aunque el empleo de tratamientos previos tales como el choque térmico o el uso de sustancias químicas han mostrado ser eficientes en el control de la actividad metanogénica del inóculo su uso a gran escala resulta poco práctico. Por otra parte la principal desventaja del uso de gránulos productores de hidrógeno consiste en el largo periodo de tiempo requerido para su obtención.

En este trabajo se observó que la adaptación continua del lodo anaerobio granular inoculado bajo un TRH de 5.5 horas y un pH de 4.5 permitió adaptar a dichos gránulos para la producción de hidrógeno en un tiempo menor al reportado en la literatura. De igual manera fue posible suprimir la actividad metanogénica de los gránulos inoculados debido a la presión de selección impuesta mediante la operación continua del reactor sin la necesidad de recurrir a un pretratamiento térmico o químico.

Así pues, la metodología de adaptación en continuo (TRH 5.5 horas y pH 4.5) resulta ser una opción práctica para la obtención de inóculo productor de hidrógeno a partir del lodo anaerobio granular ya existente.

7. CONCLUSIONES

Las dos estrategias de puesta en marcha permitieron la obtención de un inóculo productor de bio-hidrógeno a partir de un lodo anaerobio granular sin la necesidad de aplicar algún tratamiento previo, lo cual se logró mediante la aplicación de una presión de selección dada por el uso de TRH cortos y pH bajo.

La producción de hidrógeno en ambos casos estuvo asociada a la producción de ácido butírico y ácido acético, principalmente.

La estrategia de arranque en discontinuo permitió obtener un inóculo productor de hidrógeno; sin embargo, no fue posible suprimir la actividad metanogénica del inóculo, lo cual se logró con la estrategia de arranque en continuo.

Por lo anterior, se recomienda el uso de la estrategia de arranque en continuo para obtener un inóculo productor de hidrógeno sin la necesidad de que el inóculo reciba algún tratamiento previo.

8. BIBLIOGRAFÍA

Akutsu Y, Lee DY, Chi, YZ, Li YY, Harada H. Thermophilic fermentative hydrogen production from starch-wastewater with bio-granules. *Int J Hydrogen Energy*.**2009**;34:5061-5071.

Alalayah WM, Kalil, MS, Kadhum AAH, Jahim JM, Alauj NM. Effect of environment parameters on hydrogen production using clostridium saccharoperbutylacetonicum N1-4(ATCC 13564). *Ame J Enviromental Sciences*.**2009**;5:80-86.

APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th edition. Washington, DC, USA. American Public Health Association.**1992**. Water Environment Federation.

Antonopoulou G, Gavala HN, Skiadas KA, Lyberatos, G. Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresour Technol*.**2008**;99:110-119.

Barry D., Drolet B. Communications Departement of the ministeres des Ressources naturelles.[Serien en Internet] **2011**[Consultado 2012 Agosto12] [aprox 17pp]. Disponible en:

http://www.mrn.gouv.qc.ca/english/publications/energy/path_future.pdf

Bedoya A, Castrillón JC, Ramírez JE, Vásquez JE, Arias M. Producción Biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte. *Revista DYNA*.**2007**;154:137-157.

Caldwell DR. *Microbial Physiology and Metabolism*. 1^{era}.edicion.United States of America Wm. C. Brown Publishers,**1995**:128-129.

Carvajal, C.Efecto de la temperatura en la producción de hidrógeno a partir de las aguas residuales. Querétaro, Qro. Instituto de Ingeniería, Unidad Académica Juriquilla UNAM. Tesis para obtener el título de Maestro en Ingeniería Ambiental. p. 51-57.

Chang FY, Lin CY. Fermentative hydrogen production using granulated sewage sludge microflora. *Environ Eng and Manag Journal*.**2007**;17:57-62.

Chen SD, Lee KS, Lo YC, Chen WM, Wu JF, Lin CY, Chang JS. Batch and continuous biohydrogen production from starch hydrolysate by Clostridium species. *Int J Hydrogen Energy*.**2008**;33:1803-1812.

- Chen** WH, Sung S, Chen SY. Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects. *Int J Hydrogen Energy*.**2009**;34:227-2234.
- Cubillos**, G, Arrue, R, Jeison, D, Chamy, R, Tapia, E, Rodriguez, J, Ruiz-Filippi, G. Simultaneous effects of pH and substrate concentration on hydrogen production by acidogenic fermentation.[Serie en Internet] **2009** [consultado 2012 Septiembre 17];13(1):[aprox 6 pp]. Disponible en:<http://www.scielo.cl/pdf/ejb/v13n1/a11.pdf>
- Datar** R, Huang J, Maness PC, Mohagheghi A, Czernik S, Chornet E. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with steam-explosion process. *Int J Hydrogen Energy*.**2007**;32:932-939.
- Diekert** G, Wohlfarth, G. Metabolism of homoacetogens. Antoine van Leeuwenhoek. *Journal of General and Mol Micro*.**1994**;66:209-221.
- Ding** J, Liu BF, Ren NQ, Xing DF, Guo WQ, Xu JF, Xie GJ. Hydrogen production from glucose by co-culture of *Clostridium Butyricum* and immobilized *Rhodospseudomonas faecalis* RLD-53. *Int J Hydrogen Energy*.**2009**;34:3647-3652.
- Dubois** M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substrates. *Anal Chem*.**1956**;28:350-356.
- Fang**, H.P., Liu, H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by mixed cultura. *Bioresour Technol*.**2002**;82:87-93
- Fang** HH, Liu H, Zhang T. Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnol Bioeng*.**2002**;78:44-52.
- Frey** M. Hydrogenases: Hydrogen-Activating Enzymes. *Chem BioChem*.**2002**;3:153-160.
- Garrigues** C, Loubiere P, Lindley ND, Cocaign-Bousquet M. Control of the shift from Homolactic Acid to Mixed-Acid Fermentation in *Lactococcus lactis*: Predominant Role of the NADH/NAD⁺ Ratio. *J Bacteriology*.**1997**;179:582-587.
- Gomez** X, Fernandez C, Fierro J, Sanchez ME, Escapa A, Moran A. Hydrogen Production: Two stage processes for waste degradation. *Bioresour Technol*.**2011**;102:8621-8627.
- Gottschalk**, G. *Bacterial Metabolism*. 2nda. edicion. USA: Springer, **1986**:224-238.

- Gottwald M, Gottschalk G.**The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the site from acid to solvent formation. *Archives of micro.* 1985;143:42-46.
- Guervós E.**El hidrógeno como alternativa energética del futuro. [serie en internet] **2003** [consultado 2012 noviembre 7] [aprox.3pp.] Disponible en:<http://estherguervos.galeon.com/2ha.pdf>
- Hafez H, Baghchehsaraee B, Nakhla G, Karamanez D, Margaritis A, El Naggat.** Comparative assesment of decoupling of biomass and hydraulic retention times in hydrogen production bioreactors. *Int J Hydrogen Energy.* **2009**;34:7603-7611.
- Hafez H, Nakhla G, Naggat MHE, Elbeshbishy E, Babhchehsaraee B.**Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *Int J Hydrogen Energy.***2010**;35:81-92.
- Hallenbeck P.**Biohydrogen Production: Current Status and Future Prospects. [serie en internet]**2012**[consultado 2012 diciembre 23][aprox. 7pp] Disponible en :<http://www.whec2012.com/wp-content/uploads/2012/06/WHEC-2012-PCH.pdf>
- Hulshoff LW, de Castro Lopes SI, Lettinga G, Lens PNL.**Anaerobic sludge granulation.*Water Res.***2004**;38:1376-1389.
- Hung CH, Cheng CH, Guan DW, Wang ST, Hsu SC, Liang CM, Lin CY.** Interactions between *Clostridium sp.* And other facultative anaerobes in a self-formed granular sludge hydrogen producing bioreactor. *Int J Hydrogen Energy.***2011**;36: 8704-8711.
- Hussy I, Hawks FR, Dinsdale R, Hawkes DL.**Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. *Int J Hydrogen Energy.***2005**;30:471-483.
- Korskinen K.** The development and microbiology of bioprocesses for production of hydrogen and ethanol by dark fermentation. [serie en internet] **2008** [consultado 20: <http://dspace.cc.tut.fi/dpub/bitstream/handle/123456789/165/koskinenp.pdf?sequence=1>
- Kapdan IK, Kargi F.**Review.Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Micro Tech.***2006**;38:569-582.
- Kim DH, Kim HS, Ko IB, Lee CY, Shin HS.**Start- up strategy for continuous fermentative hydrogen production:Early swichover from batch to continuous operation. *Int J Hydrogen Energy.* **2008**;33:1532-1541.

Kim TH, Lee Y, Chang KH, Hwang SJ. Effects of initial lactic acid concentration, HRTs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. *Bioresour Technol* .**2012**;103:9071-7.

Kluiters SCA. Status review on membrane systems for hydrogen production. Intermediate report EU project MIGREYD NNE5-2001-670.[serie en internet]**2004**[consultado 2012 junio 2]Disponible en: <ftp://www.nrg-nl.com/pub/www/library/report/2004/c04102.pdf>

Krupp M, Widmann R. Biohydrogen production by dark fermentation: Experiences of continuous operation in large lab scale. *Int J Hydrogen Energy*. **2009**;34:4509-4516.

Jung KW, Kim DH, Shin HS. A simple method to reduce the start-up period in a H₂-producing UASB reactor. *Int J Hydrogen Energy*. **2011**;36:1466-1473.

Larsen H, Feidenhans'l R, Petersen SL..Hydrogen system energy technologies in global, European and Danish perspective. [serie en internet]**2004**[consultado 2012 julio 13]Disponible en : http://130.226.56.153/rispubl/energy_report3/ris-r-1469s23-30.pdf

Levin DB, Chahine R.Challenges for renewable hydrogen production from biomass. *Int J Hydrogen Energy*. **2009**;35: 4962-4969.

Lin CH, Wu SY, Lin PJ, Chang JS, Hung CH, Lee KS, Chang FY, Chu CY, Cheng CH, Lay CH, Chang AC. Pilot-scale hydrogen fermentation system start-up performance. *Int J Hydrogen Energy*.**2010**;35:13452-13457.

Lin CH, Wu CC, Hung CH. Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures. *Int J Hydrogen Energy*. **2008**;33:43-50.

Li YF, Ren NQ, Chen Y, Zheng GX. Ecological mechanism of fermentative hydrogen production by bacteria. *Int J Hydrogen Energy*.**2007**;32:755-760.

Li J, Zheng G, He J, Chang S, Qin Z. Hydrogen-producing capability of anaerobic activated sludge in three types of fermentations in a continuous stirred-tank reactor.*Biotech Advan*.**2009**;27:573-577.

Liu H, Fang HHP.Hydrogen production from wastewater by acidogenic granular sludge.*Science and Technol*.**2009**;47:153-158.

Luo G, Xie L, Zou Z, Wang W, Zhou Q, Shim H. Anaerobic treatment of cassava stillage for hydrogen and methane production in continuously stirred tank reactor (CSTR) under high organic loading rate (OLR). *Int J Hydrogen Energy*. **2010**;35:11733-11737.

Mandal B, Nath K, Das D. Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnol Lett*. **2006**;11:831-835.

Manikkandan TR, Dhanasekar R, Thirumavalavan K. Microbial Production of Hydrogen from Sugarcane Bagasse using *Bacillus Sp.* *Int J Chemical Technol Research*. **2009**;1:344-348.

Mathews C, Van Holde KE, Ahern KG. *Bioquimica*. 3ra.edicion. Madrid: Addison Wesley. **2002**:795.

Mizuno O, Dindsdale R, Hawkes FR, Hawkes DL, Noike T. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresources. Tech*. **2000**;73:59-65.

Mohan VS. Fermentative hydrogen production with simultaneous wastewater treatment: influence of pretreatment and system operation conditions. *Journal of Scient and Ind Research*. **2008**;67:950-961.

Nath K, Das D. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Applied Micro Biotechnol*. **2004**;65:520-529.

Ni M, Leung DYC, Leung MKH, Sumathy K. An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Processing Technol*. **2006**;87:461-472.

Narotzky N. Wrestling For World Energy Dominance: Will Natural Gas “Outmuscle” Renewables?[serie en internet] **2011**[consultado 2011 diciembre 12] Disponible en: <http://www.greenconduct.com/articles/2011/06/17/wrestling-for-world-energy-dominance-will-natural-gas-%E2%80%9Coutmuscle%E2%80%9D-renewables/>

O-Thong S, Prasertsan P, Intrasungkha N, Dhamwichukorn S, Birkeland NK. Improvement of biohydrogen production and treatment efficiency on palm oil mill effluent with nutrient supplementation at thermophilic condition using an anaerobic sequencing batch reactor. *Enzyme and Micro Technol*. **2007**;41:583-590.

Radjaram B, Saravanane R. Start-up study of UASB reactor treating press mud for biohydrogen production. *Biomass and Bioener*. **2011**;35:2721-2728.

Ren N, Guo WQ, Wang XJ, Xiang WS, Liu BF, Wang XZ, Ding J, Chen ZB. Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy*. **2008**;33:4318-4324.

Ren NQ, Chua H, Chan SY, Tsang YF, Wang YJ, Sin N. Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors. *Bioresour Technol*. **2006**;9:1774-80.

Ren NQ, Tang J, Liu BF, Guo WQ. Biological hydrogen production in continuous stirred tank reactor systems with suspended and attached microbial growth. *Int J Hydrogen Energy*. **2010**;35:2807-2813.

Ribeiro L, Correa T, Ferreira T, Matos A, Cammarota M, Morais E, Santana V. Hydrogenase activity monitoring in the fermentative hydrogen production using heat pretreated sludge: A useful approach to evaluate bacterial communities performance. *Int J Hydrogen Energy*. **2011**;36:7543:7549.

Santamarta J. Vuelve la Energía Nuclear? *World Watch*. [serie en internet] **2006** [consultado 2012 enero 26] Disponible en :
<http://www.energiasur.com/energianuclear/NuclearSantamarta.pdf>

Saraphirom P, Reungsang A. Effect of organic loading rate on biohydrogen production from sweet sorghum syrup by anaerobic mixed cultures in anaerobic sequencing batch reactor. *Int J Hydrogen Energy*. **2010**;4:55-62.

Sedigas. Asociacion Espanola del gas. Informe [serie en internet] **2011** [consultado 2012 marzo 14] Disponible en :
http://www.sedigas.es/informeanual/2011/1.3_ConsumoEnergia.htm

Shizas I, Bagley DM. Fermentative hydrogen production in a system using anaerobic digester sludge without heat treatment as a biomass source. *Water Science and Tech*. **2005**;52:139-144.

Show KY, Zhang ZP, Lee DJ. Design of biorreactors for biohydrogen production. *Journal of Scien and Ind Resea*. **2008**;67:941-949.

Skidmore B. Syngas Fermentation: Quantification of Assay Techniques, Reaction Kinetics, and pressure Dependecies of the Clostridial P11 Hydrogenase. Departamento de Ingenieria Quimica, Universidad de Brigham Young. Tesis para obtener el título de Maestro en ciencias. **2010**:109-110.

- Smolinski** A, Howaniec N. Sustainable production of a clean energy carrier-hydrogen. *Ecological Chem and Eng.* **2009**;16:3-7.
- Taconi** KA, Zappi ME, French WT, Brown LR. Feasibility of methanogenic digestion applied to a low pH acetic acid solution. *Bioresour Technol.* **2008**;98:1597-1585.
- Tamagnini** P, Axelsson R, Lindberg P, Oxelfelt F, Wunschiers R, Lindblad P. Hydrogenases and Hydrogen Metabolism of Cyanobacteria. *Micro and Mol Reviews.* **2003**;66:1-20.
- Tao** Y, Chen Y, Wu Y, He Y, Zhou Z. High Hydrogen yield from a two-steps process of dark-and-photo-fermentation of sucrose. *Int J Hydrogen Energy.* **2006**;32:200-206.
- Tucker** L, Gumus S, Tapan A. Biohydrogen production: molecular aspects. *J Scientific and Ind Res.* **2008**;67:994-1016.
- Van** EWJ, Martens AA, Claassen AMP. Effect of carbon Dioxide and Temperature on H₂ producing cultures of the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor Saccharolyticus*. 15th world hydrogen energy conference, yokohama, Japon. **2009**:06-30.
- Van Ginkel** SW, Logan B. Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Resear.* **2005**;39:3819-3826.
- Verma** S. Anaerobic Digestion of Biodegradable Organics in Municipal Solid Wastes. Master of Science Degree in Earth Resources Engineering. **2002**
- Vignais** PM. Molecular Biology of Microbial Hydrogenases. *Current Issues in Molecular Biology.* **2004**;6:159-88.
- Wang** J, Wan W. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *Int J Hydrogen Energy.* **2008**;33:2934-2941.
- Wang** J, Wan W. Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. *Int J Hydrogen Energy.* **2009**;4:799-811.
- White**, D. The physiology and Biochemistry of Prokaryotes. 3era edicion. Nueva York: Oxford University Press, Inc., **2007**:394-398.
- Winter** JC. Hydrogen energy-Abundant, efficient, clean: A debate over the energy-system-of-change. *Int J Hydrogen Energy.* **2009**;34:S1-S52.

Yoshida A, Nishimura T, Kawaguchi H, Inui M, Yukawa H. Enhanced hydrogen production from glucose using Idh- and frd-inactivated Escherichia coli strains. *Applied Micro Biotech.* **2006**;73:67-72.

Zhang ZP, Show KY, Tay JH, Liang DT, Lee DJ. Enhanced Continuous Biohydrogen Production by Immobilized Anaerobic Microflora. *Energy and Fuels.* **2008**;22:87-92.

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

Zhang ZP, Show KY, Tay JH, Liang DT, Lee DJ, Su A. The role of acid incubation in rapid immobilization of hydrogen-producing culture in anaerobic upflow column reactors. *Int J Hydrogen Energy.* **2008**;33:5151-5160.

Zhou X, Ren N. Acid resistance of methanogenic bacteria in a two-stage anaerobic process treating high concentration methanol wastewater. *Front Environ Sci Eng China.* **2007**;1:53-56.

Zhu H, Beland M. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *Int J Hydrogen Energy.* **2006**;31:1980-1988.