



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

INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE
EFLUENTES DE FERMENTACIÓN EMPLEANDO FOTOBACTERIAS
INMOVILIZADAS

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

PRESENTA:
ELIANE GUEVARA LÓPEZ

TUTOR PRINCIPAL
DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA
COMITÉ TUTOR
DRA. GABRIELA E. MOELLER CHÁVEZ, UPEMOR
DR. SEBASTIÁN JOSEPH PATHIYAMATTOM, IER

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO. ENERO DE 2018.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Elvia Inés García Peña
Secretario: Dra. Georgina Fernández Villagómez
Vocal: Dra. Marcia Morales Ibarría
1 er. Suplente: Dra. Gabriela Eleonora Moeller Chávez
2 do. Suplente: Dr. Germán Buitrón Méndez

Lugar donde se realizó la tesis:
Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas,
Unidad Académica Juriquilla-Querétaro,
Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México

TUTOR DE TESIS:

Dr. Germán Buitrón Méndez

FIRMA

Se agradece el financiamiento de este trabajo de investigación al proyecto

CONACYT-Ciencia Básica, número 241718.

Se agradece al CONACYT por la Beca otorgada para la realización de estudios de

Doctorado.

Dedicatoria

A mis padres, por todo el amor y confianza brindadas. Porque siempre me impulsaron a buscar más y porque aun cuando no comprendieran del todo mis decisiones, jamás dejé de escucharlos decir: “Lo que decidas te apoyamos”.

A Laz y Steph, por todo su apoyo y porque ustedes, más que nadie, entienden y comparten mis sueños.

Caro y Fer, porque sin importar la distancia han estado siempre conmigo. Gracias por el apoyo y cariño.

A Xime, Emi y Santi, por enseñarme que hasta las cosas más simples pueden ser sorprendentes, que siempre hay un motivo para estar feliz y porque con tan sólo una sonrisa son capaces de transformar un día.

A todos los amo

Agradecimientos

Al Dr. Germán Buitrón por darme la oportunidad de trabajar en el grupo. Por sus consejos, comentarios y críticas que me permitieron mejorar el proyecto y crecer profesionalmente.

A los investigadores del Lipata: Dr. Alejandro Vargas, Dr. Iván Moreno, Dra. Idania Valdez, Dr. Julián Carrillo y Dr. Guillermo Quijano por compartir su conocimiento y experiencia durante mi estancia en el grupo.

Al comité tutorial Dra. Gabriela Moeller y Dr. Sebastian J. Pathiyamattom porque sus comentarios y aportaciones al proyecto contribuyeron a mejorarlo.

A los revisores y jurados de tesis Dra. Elvia Inés García, Dra. Marcia Morales y Dra. Georgina Fernández por las críticas y sugerencias hechas al trabajo que fueron de gran importancia.

A Ricardo y Jazmín, por convertirse en mi familia en Querétaro y ser mi línea a tierra. Por todo su apoyo, confianza y amistad incondicional.

A Marisol Córdova y Juan Carlos Higareda por creer siempre en mí y por todo el apoyo brindado sin importar la distancia.

A Isaac Monroy y Luis Acosta, con los que trabajé en el proyecto. Gracias por toda su ayuda y aporte.

A Jaime Pérez y Gloria Moreno por el apoyo técnico, críticas y aportaciones a mi trabajo durante mi estancia en el Lipata y por la amistad brindada.

Javier y Lucy porque su apoyo y ayuda en los trámites también fueron importantes para lograr la meta.

A mis amigos, Sebas, Liz, René, Manuel, Martín, Gera, Alberto, Ivonne, Julián, Litza, Aidé y Citlali por todos los momentos compartidos dentro y fuera del Lipata, por las charlas, bromas, consejos y ayuda. Ustedes hicieron más amena mi estancia. Gracias por todo su cariño y apoyo.

A mis compañeros del Lipata, con los que tuve la oportunidad de compartir estos cuatro años.

Índice General

Índice General	I
Índice de figuras	V
Índice de tablas	VII
Abreviaturas	IX
Resumen	XI
Abstract	XIII
Introducción	1
Capítulo 1. Antecedentes	3
1.1 El hidrógeno como vector energético	3
1.2 Propiedades del hidrógeno	4
1.3 Procesos biológicos para la producción de hidrógeno	5
1.3.1 Biofotólisis	6
1.3.2 Fermentación oscura	8
1.3.3 Celdas de electrólisis microbiana	9
1.3.4 Fotofermentación	9
1.3.5 Sistemas híbridos	10
1.4 Metabolismo de las bacterias PNS	10
1.4.1 Inhibidores de la nitrogenasa	14
1.5 Factores que afectan el proceso fotofermentativo	15
1.5.1 Inóculo	16
1.5.2 Sustrato	20
1.5.3 Temperatura y pH	26
1.5.4 Tipo de iluminación (Longitud de onda, λ)	30
1.5.5 Intensidad luminosa	32
1.5.6 Protocolo de iluminación	34
1.6 Inmovilización de células	39
1.7 Sistemas en continuo para la producción de hidrógeno por fotofermentación	42
1.8 Uso de efluentes de fermentación oscura	45
Capítulo 2. Hipótesis y Objetivos	50
2.1 Hipótesis	50
2.2 Objetivos	50
2.2.1 Objetivo General	50
2.2.2 Objetivos Particulares	50
Capítulo 3. Materiales y Métodos	52
3.1 Estrategia Experimental	52
3.2 Inóculo	54

3.3 Medios de cultivo	55
3.3.1 Medio de Crecimiento	55
3.3.2 Medio de producción de hidrógeno	55
3.4 Determinación del crecimiento microbiano	55
3.4.1 Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)	55
3.4.2 Curva SSV vs Absorbancia	56
3.4.3 Determinación de proteína celular	57
3.5 Consumo de sustrato	57
3.5.1 Ácidos Grasos Volátiles (AGV's) y etanol	57
3.5.2 Demanda Química de Oxígeno soluble (DQO _s)	58
3.6 Compuestos inhibitorios	58
3.6.1 Nitrógeno amoniacal (NH ₃ -N)	58
3.7 Biogás producido	59
3.7.1 Composición del biogás	59
3.8 Intensidad luminosa y pH	59
3.9 Análisis molecular de la comunidad microbiana	59
3.9.1 Extracción de ADN	59
3.9.2 Análisis de las especies microbianas	60

Capítulo 4. Evaluación de materiales de soporte para la inmovilización de un consorcio fotofermentativo productor de hidrógeno	62
4.1 Introducción	63
4.2 Estrategia Experimental	65
4.2.1 Consorcio bacteriano y condiciones de cultivo	65
4.2.2 Materiales de soporte	66
4.2.3 Inmovilización del consorcio	67
4.2.4 Producción de hidrógeno por el consorcio inmovilizado	67
4.2.5 Métodos analíticos	68
4.2.6 Extracción de ADN y pirosecuenciación	68
4.3 Resultados y discusión	69
4.3.1 Caracterización de los soportes	69
4.3.2 Producción de hidrógeno durante la colonización	69
4.3.3 Biomasa inmovilizada	71
4.3.4 Producción de hidrógeno por el consorcio inmovilizado	72
4.3.5 Comunidad bacteriana en el consorcio productor de hidrógeno	74
4.4 Conclusiones	75

Capítulo 5. Optimización de las condiciones de iluminación y pH de un consorcio inmovilizado de bacterias PNS	76
5.1 Introducción	77
5.2 Estrategia Experimental	79
5.2.1 Inóculo y condiciones de cultivo	79
5.2.2 Inmovilización	80
5.2.3 Selección de la fuente de iluminación	80

5.2.4 Optimización de la intensidad luminosa y el pH inicial	81
5.2.5 Métodos analíticos	82
5.2.6 Diseño Experimental	82
5.3 Resultados y discusión	83
5.3.1 Observación de la biopelícula (imágenes SEM).....	83
5.3.2 Selección de la fuente de iluminación	84
5.3.3 Optimización del pH inicial y la intensidad luminosa usando lámparas de tungsteno	85
5.4 Conclusiones	93
Capítulo 6. Efecto del tiempo de retención hidráulica sobre la producción continua de hidrógeno en un fotobiorreactor con biomasa inmovilizada	95
6.1 Introducción	96
6.2 Estrategia experimental	97
6.2.1 Inóculo y condiciones de cultivo	97
6.2.2 Fotobiorreactor y modo de operación.....	97
6.2.3 Identificación molecular de las especies microbianas del consorcio a distintos TRH.....	99
6.3 Resultados.....	99
6.3.1 Efecto del TRH sobre la producción de hidrógeno.....	99
6.3.2 Efecto del TRH sobre el consumo de sustrato	104
6.3.3 Efecto del TRH sobre la comunidad microbiana	107
6.4 Conclusiones	113
Capítulo 7. Evaluación de la producción de hidrógeno en un fotobiorreactor en continuo con iluminación natural, alimentado con un efluente de fermentación oscura	114
7.1 Introducción	115
7.2 Estrategia experimental	116
7.2.1 Inóculo y condiciones de cultivo	116
7.2.2 Fotobiorreactor y modo de operación.....	117
7.2.3 Métodos analíticos	119
7.3 Resultados.....	119
7.3.1 Producción de hidrógeno en continuo con iluminación solar.....	119
7.3.2 Consumo de sustrato durante la operación en continuo con iluminación solar	123
7.4 Conclusiones	128
Capítulo 8. Efecto de la concentración de molibdeno, vanadio y hierro sobre la producción de hidrógeno y la actividad nitrogenasa	129
8.1 Introducción	129
8.2 Estrategia experimental	133
8.2.1 Inóculo y condiciones de cultivo	133

8.2.2 Evaluación del efecto de la concentración de Mo, Fe y V en la producción de H ₂	133
8.2.3 Diseño Experimental	134
8.2.4 Evaluación de la actividad nitrogenasa	135
8.2.5 Técnicas analíticas.....	135
8.3 Resultados.....	136
8.3.1 Efecto de la concentración de Mo, Fe y V sobre la producción de H ₂	136
8.3.2 Efecto de la concentración de Mo, Fe y V sobre la actividad nitrogenasa	141
8.4 Conclusiones	143
Conclusiones Generales	144
Referencias	148
Anexos	168
A.1. ANOVAs para evaluar el efecto del tipo de iluminación sobre H _{máx} y ΔDQO	168
A.2. ANOVAs para evaluar el efecto del pH inicial y la intensidad luminosa en H _{máx} , R _{máx} y ΔDQO	168
A.3. ANOVAs para evaluar el efecto de la concentración de Fe, Mo y V sobre H _{máx} , R _{máx} , λ, ΔDQO y actividad nitrogenasa.....	170
Productos del proyecto de investigación	173
Artículos en revistas indizadas	173
Artículos de Divulgación	173
Presentaciones en Congresos.....	174

Índice de figuras

Figura 1.1. Diagrama de la ruta metabólica para la producción de H ₂ por fotofermentación a partir de azúcares y ácidos orgánicos.	13
Figura 1.2. Bioquímica de la descomposición de la glucosa por bacterias fermentativas y fotosintéticas en sistemas híbridos de producción biológica de H ₂	45
Figura 1.3. Estrategias para la producción de H ₂ usando fermentación oscura y fotofermentación.....	47
Figura 3.1. Diagrama general de la Estrategia Experimental seguida durante el desarrollo de la tesis.....	52
Figura 4.1. Soportes evaluados para la inmovilización del consorcio.....	66
Figura 4.2. Producción acumulada de H ₂ en el tiempo y ajuste de Gompertz.....	70
Figura 4.3. Cuantificación de la biomasa fija durante la evaluación de los soportes colonizados para la producción de H ₂	72
Figura 4.4. Producción de H ₂ con la biomasa inmovilizada durante cuatro ciclos en lote (425 h)	73
Figura 4.5. Caracterización microbiana del consorcio productor de H ₂	74
Figura 5.1. Espectro típico de absorción de las bacterias PNS dado por los carotenoides (*) y las bacterioclorofilas (**).	77
Figura 5.2. Espectros de emisión de las fuentes de luz evaluadas	81
Figura 5.3. Micrográficas de la biopelícula formada sobre las fibras de luffa.....	83
Figura 5.4. Superficie de respuesta para H _{máx} en función del pH _i y la intensidad luminosa.....	86
Figura 5.5. Superficie de respuesta para R _{máx} en función de pH _i y la intensidad luminosa.....	88
Figura 5.6. Gráfico de superficie de respuesta para ΔDQO en función del pH _i y la intensidad luminosa	91
Figura 6.1. Esquema del sistema utilizado para la producción de H ₂ por fotofermentación.....	98
Figura 6.2. Velocidad de producción de H ₂ (R _{H2}), pH y SSV durante la operación en continuo del reactor con las condiciones descritas en la Tabla 6.1	101
Figura 6.3. Concentración de AGV's y DQO en el efluente durante la operación del reactor con las condiciones descritas en la Tabla 6.1	105
Figura 6.4. Especies bacterianas presentes en el consorcio durante la operación del reactor en las condiciones descritas en la Tabla 6.1	108

Figura 6.5. Arqueas identificadas en el consorcio microbiano durante la operación del fotobiorreactor.....	110
Figura 7.1. Esquema del sistema utilizado para la fotofermentación en continuo con luz solar.....	118
Figura 7.2. Producción de H ₂ en continuo con iluminación solar.....	121
Figura 7.3. Concentración de AGV's, glucosa y etanol durante la operación en continuo con iluminación solar	124
Figura 8.1. Superficie de respuesta para H _{máx} en función de la concentración de Fe y Mo	139
Figura 8.2. Superficie de respuesta para R _{máx} en función de la concentración de Fe y Mo	140
Figura 8.3. Efecto de la concentración de Fe en la actividad nitrogenasa.....	142

Índice de tablas

Tabla 1.1. Propiedades físicas y químicas del hidrógeno, metano y gasolina	4
Tabla 1.2. Procesos para la producción de bio-H ₂ . Ventajas, desventajas y retos.	7
Tabla 1.3. Uso de consorcios microbianos para la producción de H ₂ por fotofermentación.....	19
Tabla 1.4. Conversión teórica de distintas fuentes de carbono a H ₂	21
Tabla 1.5. Tipo de iluminación, intensidades luminosas, producciones y eficiencias fotoquímicas reportadas en la bibliografía	35
Tabla 1.6. Estudios de producción de H ₂ con células inmovilizadas por atrapamiento en geles.....	40
Tabla 1.7. Estudios de producción de H ₂ por células inmovilizadas en biopelículas	41
Tabla 1.8. Tiempos de retención hidráulica (TRH) reportados en fotofermentación y productividad de H ₂	44
Tabla 1.9. Producción de H ₂ por fotofermentación a partir de efluentes de fermentación oscura.....	48
Tabla 4.1. Características de los materiales de soporte	69
Tabla 4.2. Parámetros de Gompertz, remoción de DQO y pH final durante los experimentos de colonización de los soportes	71
Tabla 4.3. Comparación de la producción de H ₂ utilizando diferentes materiales de soporte.....	74
Tabla 5.1. Producción de H ₂ y remoción de DQO con las tres lámparas evaluadas a 125 W/m ² y pH _i 6.7.....	84
Tabla 5.2. Matriz del Diseño Central Compuesto mostrando los niveles evaluados para pH e intensidad luminosa y los resultados para H _{máx} , R _{máx} y ΔDQO.....	85
Tabla 6.1. Tiempos de retención hidráulica (TRH), concentración de AGV's y carga orgánica (CO) evaluados en el fotobiorreactor	99
Tabla 6.2. Comparación de la producción de H ₂ con otros estudios en continuo	103
Tabla 6.3. Resultados de la producción de H ₂ y eficiencias de conversión para las condiciones evaluadas (Tabla 6.1)	104
Tabla 7.1. Composición de los efluentes de fermentación oscura usados en el proceso.	120
Tabla 7.2. Producciones de H ₂ y consumo de sustrato alcanzadas durante la operación del reactor con iluminación solar.	125

Tabla 7.3. Comparación de la producción de H ₂ con otros reactores operando con iluminación solar.....	126
Tabla 8.1. Diseño Central Compuesto para evaluar el efecto del Fe, Mo y V sobre la producción de H ₂ y actividad nitrogenasa.....	134
Tabla 8.2. Resultados de la producción de H ₂ , remoción de DQO y actividad nitrogenasa a las distintas concentraciones de Fe, Mo y V.....	137

Abreviaturas

AGV's	Ácidos grasos volátiles
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosin trifosfato
A/V	Área/Volumen
CO	Carga orgánica
CSTR	Reactor continuo completamente mezclado
DCC	Diseño central compuesto
DQO	Demanda química de oxígeno
DQO _{in}	Demanda química de oxígeno del influente
DQO _s	Demanda química de oxígeno soluble
FC	Fuente de carbono
Fd	Ferredoxina
Fd _{red}	Ferredoxina reducida
FO	Fermentación oscura
GI	Grados de libertad
H	Producción de hidrógeno a un tiempo, t
h _{luz}	Hora de iluminación
H _{máx}	Volumen máximo de H ₂ producido
LCE	Eficiencia fotoquímica (<i>light conversion efficiency</i>)
LED	Diodo emisor de luz (<i>light emitting diode</i>)
MSR	Metodología de superficie de respuesta
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
NH ₃ -N	Nitrógeno amoniacal
OD	Densidad óptica
OD ₆₆₀	Densidad óptica a 660 nm
OD ₇₅₀	Densidad óptica a 750 nm

PEAD	Polietileno de alta densidad
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Polihidroxibutirato
pH _i	pH inicial
pH _f	pH final
PNS	Púrpura fototrófica, púrpura no sulfurosas (<i>Purple non-sulfur</i>)
PS	Fotosistema
PVC	Policloruro de vinilo
redox	Óxido-reducción
R _{H2}	Velocidad de producción de hidrógeno
R _{máx}	Velocidad máxima de producción de hidrógeno
S ₀	Sustrato inicial
SEM	Microscopía electrónica de barrido (<i>Scanning electron microscopy</i>)
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
SV	Sólidos volátiles
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (<i>Tricarboxylic acid cycle</i>)
TRH	Tiempo de retención hidráulica
UV	Ultravioleta
UV/VIS	Ultravioleta/Visible
X ₀	Biomasa inicial
Y _{H2}	Conversión de sustrato
Y _{H2^a}	Conversión de sustrato calculado con base al sustrato alimentado
Y _{H2^c}	Conversión de sustrato calculado con base al sustrato consumido
ΔDQO	Remoción de materia orgánica medida como DQO
λ	Fase de latencia

Resumen

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de las variables de proceso en la fotofermentación con un consorcio microbiano inmovilizado de bacterias púrpura fototróficas, incrementando la producción de hidrógeno (H_2) en continuo a partir de ácidos grasos presentes en efluentes de fermentación oscura.

La primera etapa consistió en la selección del material de soporte que permitiera una alta retención de biomasa y producción de H_2 . Se evaluaron barras de acrílico, cilindros de polietileno y fibras de luffa (estropajo natural). Una vez seleccionado el soporte se evaluó el efecto del tipo de iluminación (tungsteno, fluorescente y LED amarillo), intensidad luminosa y pH inicial sobre la producción de H_2 usando técnicas estadísticas. Se eligieron estas variables debido a su influencia en la síntesis de pigmentos, actividad enzimática y síntesis de ATP. Las condiciones de iluminación y pH optimizadas se utilizaron en la operación de un reactor tubular en continuo con ciclos luz/oscuridad 12h/12h, evaluando el efecto del Tiempo de Retención Hidráulica (TRH). El uso de energía solar y un efluente de fermentación oscura también fue evaluado en la operación en continuo del reactor. Por último, se evaluó el efecto de la concentración de molibdeno, hierro y vanadio en la producción de H_2 y la actividad nitrogenasa.

Las fibras de luffa fueron el soporte más adecuado debido a que permitieron una mayor cantidad de biomasa inmovilizada por su relación área/volumen, sin afectar la iluminación en el sistema y la producción de H_2 . Las lámparas de tungsteno fueron la fuente de iluminación seleccionada debido al espectro de luz continuo que proporcionan. La optimización por superficie de respuesta estimó que un pH inicial de 6.5 y una intensidad luminosa de 221 W/m^2 permiten incrementar la producción de H_2 y el consumo de sustrato. La operación en continuo del reactor mostró que TRH largos favorecen el desarrollo de arqueas hidrogenotróficas y especies no productoras de H_2 , lo que disminuye la eficiencia del proceso. Un TRH

de 48 h permitió alcanzar una velocidad de 28 mL/Lh_{luz}. En una primera caracterización del consorcio se determinó que *Rhodopseudomonas palustris* era la especie responsable de la producción de H₂, sin embargo, la operación a distintos TRH afectó la comunidad microbiana. Dos especies más se asociaron a la producción de H₂: *Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodobacter blasticus*. Durante la operación con iluminación solar, la intensidad luminosa y la temperatura sólo fueron adecuadas para la fotofermentación en un lapso de 8 h por día, lo que disminuyó la productividad. Concentraciones de Fe y Mo de 11.7 y 1.1 mg/L permitieron incrementar la producción de H₂. El escalamiento del proceso aun requiere mejorar la productividad a través de estrategias de control que disminuyan el efecto de la variabilidad en la temperatura e intensidad luminosa y permitan una mayor estabilidad del consorcio microbiano.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the effect of different process variables on the photofermentation with an immobilized microbial consortium of purple non-sulfur bacteria, increasing the hydrogen (H₂) production in a continuous process using volatile fatty acids contained in dark fermentation effluents as carbon sources.

The first stage of this work consisted on the selection of the support material that favored a high amount of biomass attached to the support and a high H₂ production. Three materials were evaluated: acrylic bars, polyethylene cylinders and luffa fibers (natural sponge). After that, immobilized biomass was used to determine the effect of the initial pH, lighting source (tungsten, fluorescent and LED lamps) and light intensity using statistical techniques. These variables were selected because of their influence on the pigments, ATP synthesis and enzymatic activity. Optimized pH and lighting conditions were used in the operation of a tubular reactor using light/dark cycles 12h/12h, evaluating the effect of the hydraulic retention time (HRT). Sunlight and the use of a dark fermentation effluent as substrate was also evaluated in the continuous operation. Finally, concentration of molybdenum, iron and vanadium on hydrogen production and nitrogenase activity was evaluated.

Luffa fibers were the support material more adequate due to the high ratio area/volume that allowed a higher amount of immobilized biomass without affecting the illumination and H₂ production. Tungsten lamps were the selected light source for photofermentation because they are able to provide a continuous spectrum. Response surface optimization estimated that maximum volume of H₂ produced, hydrogen production rate and COD removal could be achieved with an initial pH of 6.5 and a light intensity of 221 W/m². Continuous operation of the reactor showed that a hydraulic retention time (HRT) higher than 48 h promote the growth of hydrogenotrophic archaea and other microbial species that do not produce H₂ and decrease process yield. A HRT of 48 h allowed to reach a H₂ production rate of 28

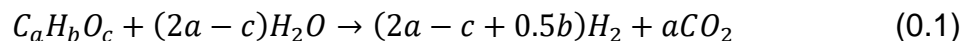
mL/Lh_{light}. The first characterization of the microbial consortium showed that *Rhodospseudomonas palustris* was the microbial species responsible for the H₂ production. Nevertheless, operation in continuous mode under different HRT had consequences on the microbial community. Other two purple non-sulfur bacterial species were associated with hydrogen production: *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter blasticus*. During the operation with sunlight, the variation in light intensity and environmental temperature affected the hydrogen production. Environmental conditions were only proper for photofermentation during a period of 8 h for day, which decreased the hydrogen yield. Iron and molybdenum concentrations of 11.7 and 1.1mg/L respectively, allowed to increase the H₂ production. Scaling up of the process and the improvement of the H₂ production, requires to avoid the variability of the system given by temperature and light intensity and a higher stability of the microbial consortium.

Introducción

El desarrollo industrial y la urbanización han conducido a la contaminación ambiental y agotamiento de los combustibles fósiles (Tao et al., 2008; Lazaro et al., 2012). En la actualidad estos combustibles siguen cubriendo más del 80% de la demanda energética mundial (World Energy Council, 2016) y su combustión genera emisiones de contaminantes como CO_x , NO_x , SO_x , C_xH_x , cenizas, y otros compuestos orgánicos (Das and Veziroğlu, 2001). El hidrógeno (H_2) es considerado como una de las mejores alternativas para la sustitución de combustibles fósiles debido entre otras cosas, a su alto poder calorífico (142 kJ/g), puede convertirse a electricidad y el único producto de su combustión es agua (Das and Veziroglu, 2008).

Actualmente éste es producido principalmente a partir de combustibles fósiles (Balat and Balat, 2009; Ghosh et al., 2017); sin embargo, los métodos biológicos de producción de H_2 tienen la ventaja de que pueden llevarse a cabo a temperatura y presión ambiente (Lazaro et al., 2012). Dentro de estos métodos se encuentra la fermentación oscura y la fotofermentación por bacterias púrpuras fototróficas (Chen et al., 2010; Adessi et al., 2017).

Se sabe que la máxima productividad de H_2 , a partir de una determinada fuente de carbono, asumiendo conversión completa del sustrato a H_2 y CO_2 está dada por la ecuación (0.1) (Koku et al., 2002):



En el caso de la fermentación oscura, se ha observado que, en las mejores condiciones, la oxidación de la glucosa conduce a la formación de 4 moles de H_2 y cantidades variables de subproductos como ácidos grasos volátiles, AGV's (Das and Veziroğlu, 2001). Estos ácidos grasos pueden ser consumidos por el

metabolismo fotoheterotrófico de las bacterias púrpura fototróficas con producción de H_2 . La combinación de fermentación oscura y fotofermentación representa una alternativa para mejorar la productividad de H_2 (Rai and Singh, 2016). Mediante la fotofermentación sería factible alcanzar hasta 8 mol de H_2 por mol de glucosa alimentado al proceso, adicionándose a las 4 moles obtenidos de la fermentación oscura (Hallenbeck and Ghosh, 2009). Además, existe la posibilidad de utilizar substratos de bajo costo, entre ellos aguas residuales para la producción de H_2 (Laurinavichene et al., 2012).

En cuanto a la fotofermentación, se han realizado diversos estudios evaluando el efecto de la fuente de carbono (Han et al., 2012), fuente de iluminación e intensidad luminosa (Argun and Kargi, 2010b), modo de operación del reactor (Yetis et al., 2000), TRH (Shi and Yu, 2006), inmovilización de células (Zhu et al., 1999a), entre otros. Sin embargo, los principales inconvenientes de la mayoría de los trabajos son la optimización variable por variable y el uso de cepas puras, lo que hace a los procesos poco prácticos para ser llevados a nivel industrial (Das and Veziroglu, 2008).

El uso de consorcios microbianos inmovilizados para la producción de H_2 por fotofermentación a partir de ácidos grasos contenidos en efluentes de fermentación oscura y la optimización de variables de proceso como pH inicial, tipo de iluminación, intensidad luminosa y TRH en la operación en continuo, con ayuda de técnicas estadísticas, pueden mejorar el rendimiento del proceso y la velocidad de producción de H_2 .

Capítulo 1. Antecedentes

1.1 El hidrógeno como vector energético

Debido al crecimiento poblacional, industrialización y estilo de vida, la demanda energética mundial ha incrementado a lo largo de los años (Ball and Wietschel, 2009). En el 2016, el 86% de esta demanda se siguió cubriendo con combustibles fósiles (petróleo, gas natural y carbón) (World Energy Council, 2016). Sin embargo, el uso de estos combustibles ha representado la principal fuente de emisiones de gases de efecto invernadero contribuyendo al calentamiento global (Balat, 2008). Aunado a esto, por su naturaleza no renovable y su distribución no homogénea, es difícil que dichos combustibles puedan seguir cubriendo la creciente demanda (Dincer and Acar, 2015).

Los bioenergéticos se proponen como una alternativa para la sustitución de combustibles fósiles, principalmente en el sector transporte. Más aun, estos ofrecen una oportunidad para el crecimiento económico de países en desarrollo (Balat and Balat, 2009; World Energy Council, 2016). Sin embargo, el precio de los biocombustibles con respecto al de los combustibles fósiles y la falta de financiamiento para investigación y desarrollo en lo que respecta a biocombustibles avanzados, no favorecen el desarrollo de estos a corto y mediano plazo (World Energy Council, 2016).

El H₂ como un vector energético resulta promisorio debido, entre otras cosas, a la posibilidad de producirlo de cualquier fuente de energía primaria, y a largo plazo podría producirse únicamente de fuentes renovables. Por otro lado, al no contener carbono, el H₂ también puede contribuir a la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero (Ball, 2009).

1.2 Propiedades del hidrógeno

Además de la posibilidad de ser generado por fuentes renovables y ser un vector energético con prácticamente cero emisiones, el H₂ presenta otras características que le dan ventajas con respecto a otros combustibles (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Propiedades físicas y químicas del hidrógeno, metano y gasolina

	Hidrógeno	Metano (H/C=4)	Gasolina (H/C=1.87)
Masa molar (g/mol)	2	16	~100
Densidad (kg /m ³ , p=1 atm, T=°C)	0.09	0.72	720-780 (líquido)
Punto de ebullición (K)	20	112	310-478
Poder calorífico superior (MJ/kg)	142.0	55.5	47.3
Poder calorífico inferior (MJ/kg)	120.0	50.0	44.0
Límites de inflamabilidad (%vol)	4.0-75.0	5.3-15.0	1.0-7.6
Límites de detonación (%vol)	18.3-59.0	6.3-13.5	1.1-3.3
Energía de ignición (mJ) (mezcla estequiométrica)	0.02	0.29	0.24
Velocidad de difusión en aire (m/s)	2.00	0.51	0.17

Fuente: Balat (2008)

Dentro de estas propiedades destacan su elevado poder calorífico, los límites de inflamabilidad que permiten tener mezclas combustibles a baja concentración de H₂ y su alta velocidad de difusión que facilita la formación de mezclas uniformes y minimiza los riesgos en caso de fugas. Aun cuando una de las preocupaciones del uso del H₂ se debe a los límites de detonación que posee, cabe mencionar que la detonación es difícil cuando la mezcla no está confinada. Por otro lado, su baja densidad hace que se requiera un gran volumen para contener suficiente H₂, lo que representa una desventaja en el almacenamiento y transporte (Balat, 2008; Sharma and Ghoshal, 2015).

Actualmente, el H₂ es usado como energético principalmente en el transporte espacial y submarino, en las refinerías para desulfuración de diésel y en sistemas

de enfriamiento de generadores eléctricos de gran tamaño (Winter, 2009). La mayor parte del H_2 se produce a partir de combustibles fósiles (gasolina, gas y carbón) (Balat, 2008) a través de procesos físico-químicos; principalmente el reformado con vapor a partir de metano (Sharma and Ghoshal, 2015; Ghosh et al., 2017). Sin embargo, estos procesos requieren gran cantidad de energía y generan CO_2 contribuyendo al efecto invernadero (Balat, 2008; Hay et al., 2013). Para eliminar los efectos adversos del uso de los combustibles fósiles, el H_2 debe producirse por métodos que sean amigables con el ambiente, a partir de fuentes limpias y abundantes como la biomasa, especialmente los desechos orgánicos (Balat and Balat, 2009; Dincer and Acar, 2015; Bharathiraja et al., 2016).

1.3 Procesos biológicos para la producción de hidrógeno

Los procesos biológicos para la producción de H_2 , a diferencia de los químicos y electroquímicos, son catalizados por microorganismos en medio acuoso, a temperatura ambiente y presión atmosférica (Das and Veziroglu, 2008), por lo que demandan menos energía (Show et al., 2012). Además, se pueden usar materiales renovables como sustrato, como biomasa o aguas residuales (Hay et al., 2013). Lo anterior brinda la posibilidad de instalar procesos a pequeña escala en lugares donde los sustratos estén disponibles, reduciendo costos energéticos y de transporte (Das and Veziroglu, 2008).

La producción biológica de H_2 puede clasificarse como sigue (Das and Veziroğlu, 2001; Hay et al., 2013):

- Biofotólisis de agua usando algas y cianobacterias
- Fotodescomposición de compuestos orgánicos por bacterias fotosintéticas
- Fermentación de compuestos orgánicos
- Celdas de electrólisis microbianas (MEC)
- Sistemas híbridos.

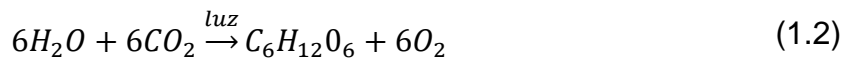
La Tabla 1.2 muestra las principales ventajas y desventajas de estos procesos.

1.3.1 Biofotólisis

Consiste en la separación microbiana de las moléculas de agua para producir H₂ y O₂, usando la luz como única fuente de energía (Oh et al., 2011). El agua funciona como donador de electrones, por lo que no requiere la adición de un sustrato orgánico. La enzima que cataliza la reacción es la hidrogenasa (Brentner et al., 2010). La producción de H₂ puede ocurrir a través de dos vías, biofotólisis directa o indirecta. La *biofotólisis directa* es llevada a cabo por algas verdes en condiciones anaerobias (Das and Veziroglu, 2008). En el proceso, se forma un mol de O₂ por cada dos moles de H₂ formado (1.1), lo que puede inhibir el proceso si el oxígeno no es removido para mantener condiciones anaerobias (Brentner et al., 2010).



La *biofotólisis indirecta* es realizada por cianobacterias (algas verdiazules) y desacopla la producción de H₂ de la de oxígeno, por lo que evita la inhibición. En este caso, los electrones o equivalentes reducidos del agua se almacenan en forma de carbohidratos de reserva (almidón) antes de usarse para la producción de H₂. Inicialmente se forman carbohidratos y oxígeno (fotosíntesis oxigénica) a partir de H₂O y CO₂ (1.2) y, posteriormente, los carbohidratos de reserva y H₂O son utilizados para producir H₂ y CO₂ (1.3). Durante el proceso también se cataliza la producción de H₂ por la nitrogenasa (1.4) como resultado de la fijación de nitrógeno (Brentner et al., 2010; Oh et al., 2011).

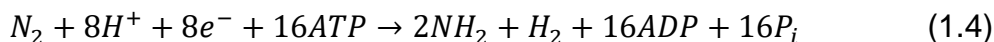
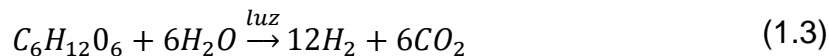


Capítulo 1

Tabla 1.2. Procesos para la producción de bio-H₂. Ventajas, desventajas y retos.

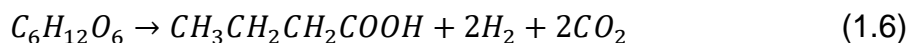
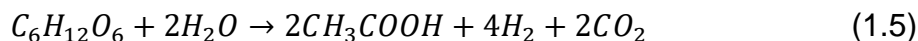
Proceso	Microorganismos	Sustrato	Ventajas	Desventajas	Retos
Biofotólisis	Microalgas y cianobacterias	Agua en presencia de luz	Sustrato abundante. Pureza hasta del 98%.	Ineficiente uso de luz. Efecto sombra y poca penetración de luz en cultivos. Necesidad de grandes áreas superficiales para cultivos. Inhibición por O ₂ .	Uso de ingeniería genética para incrementar el uso de luz y aumentar la tolerancia a O ₂ . Diseño de reactores adecuados.
Fermentación oscura	Bacterias fermentativas	Carbohidratos	Disponibilidad de sustrato. Tecnología de reactores bien desarrollada. Baja demanda energética.	Sólo una tercera parte del sustrato es convertido a H ₂ . Formación de otros productos: ácidos grasos, alcoholes, cetonas, etc.	Uso de ingeniería genética para favorecer rutas metabólicas que producen H ₂ . Mejoras en el consumo de sustrato. Purificación del biogás.
Electrohidrogenénesis. Celdas de electrolisis microbiana (MEC)	Microorganismos exoelectrógenos	Carbohidratos, ácidos grasos	Variedad de sustratos que pueden ser utilizados. No requieren el uso de cultivos puros.	Bajas velocidades de producción con relativamente altos voltajes. Producción de metano.	Diseño de electrodos más económicos, reducción de requerimientos de energía eléctrica introducida. Escalamiento.
Fotofermentación	Bacterias fotosintéticas (púrpuras no sulfurosas, PNS)	Ácidos grasos volátiles	Mayores velocidades de producción que en biofotólisis. Alta pureza del biogás producido.	Baja eficiencia en conversión de luz. Fotoinhibición a altas intensidades luminosas. Bajos rendimientos	Uso de ingeniería genética para mejorar la eficiencia en conversión de luz. Desarrollo de reactores adecuados. Escalamiento.

Fuente: Chandrasekhar et al. (2015), Ding et al. (2016), Hay et al. (2013), Hallenbeck et al. (2012) y Show et al. (2012)



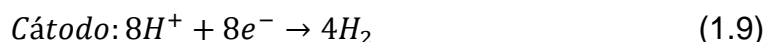
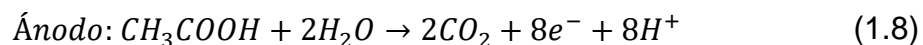
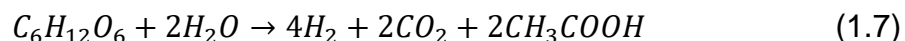
1.3.2 Fermentación oscura

En la fermentación oscura, los sustratos orgánicos (principalmente carbohidratos) son convertidos a alcoholes y ácidos orgánicos (ácidos grasos volátiles, AGV's) por bacterias anaerobias fermentativas, liberando H₂ y CO₂ (Hay et al., 2013; Bharathiraja et al., 2016). Los sustratos orgánicos representan la única fuente de energía y electrones (fermentación heterotrófica) (Show et al., 2012). Existen tres tipos de metabolismos que pueden conducir a formación de H₂ por fermentación (Oh et al., 2011): 1) a través de las enzimas piruvato:formato liasa (PFL) y formato:hidrógeno liasa (FHL), es típico de *Escherichia coli* y el género *Enterobacteriaceae*, 2) usando la piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) y la hidrogenasa Fd-dependiente (HydA), es típica de diversas especies de *Clostridium* y 3) a través de la reacción que utiliza NADPH y es catalizada por NADPH:ferredoxina oxidorreductasa (NFOR) y HydA, típica de bacterias termofílicas y algunas especies de *Clostridium*. El uso de anaerobios facultativos es preferido para este tipo de procesos, debido a una menor sensibilidad al O₂ (Das and Veziroglu, 2008). La cantidad de H₂ producido a partir de los sustratos usados (glucosa, isómeros de hexosas o polímeros como celulosa y almidón), difiere dependiendo de la ruta metabólica seguida y los productos finales generados. Como se observa en la ecuación (1.5), cuando el producto final es acetato, se generan 4 mol H₂/mol de glucosa, mientras que en la ecuación (1.6) puede observarse que, al formarse butirato, sólo se producen 2 mol H₂/mol de glucosa (Levin et al., 2004).



1.3.3 Celdas de electrólisis microbiana

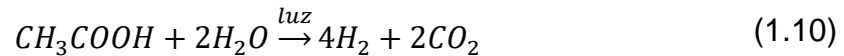
Las celdas de electrólisis microbiana (MEC) utilizan electrohidrogenesis para la conversión directa de material biodegradable en H₂. La operación se da en condiciones anaerobias y se requiere la aplicación de un voltaje externo, ya que la degradación del sustrato no es espontánea en condiciones estándar. Se producen iones H₂ en el ánodo, los cuales pasan a través de una membrana de intercambio catiónico, para combinarse en el cátodo con los electrones formando H₂ gaseoso (Hallenbeck, 2009; Show et al., 2012), bajo las reacciones descritas a continuación (1.7)-(1.9).



1.3.4 Fotofermentación

La fotofermentación implica la producción de H₂ por microorganismos fotoheterotróficos, los cuales, a diferencia de algas y cianobacterias, utilizan sustratos carbonados como donadores de electrones (Oh et al., 2011), principalmente AGV's. Aunque, la fotofermentación pueden llevarla a cabo bacterias verdes filamentosas (*Chloroflexaci*), bacterias púrpuras azufradas (*Cromatina*, *Allochromatia*), bacterias púrpura no sulfurosas (Purple Non-Sulfur, PNS: *Rhodobacter*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, etc.), entre otros microorganismos, son las bacterias PNS las que se han estudiado más ampliamente para la producción de H₂ (Sakurai et al., 2013). El proceso se lleva a cabo en anaerobiosis y es catalizado, principalmente, por la nitrogenasa en ausencia de

nitrógeno. Tomando como ejemplo el acetato, la reacción ocurre de acuerdo con la ecuación (1.10) (Ghosh et al., 2017).



1.3.5 Sistemas híbridos

Debido a que la fermentación oscura genera diversos subproductos (entre ellos AGV's), el uso de ésta en combinación con celdas de electrólisis o bien fotofermentación permite incrementar la producción de H₂ (Hallenbeck, 2009; Show et al., 2012).

La electrohidrogenesis ha sido menos estudiada que la fotofermentación y presenta muchos más retos que ésta (Hallenbeck, 2009). La combinación de fermentación oscura y lumínica ofrece un medio factible para conseguir altos rendimientos de H₂. Además, provee la posibilidad de utilizar un sinfín de sustratos, entre ellos aguas residuales, lo que permite acoplar la producción de H₂ al tratamiento de aguas (Bharathiraja et al., 2016). El acoplamiento de ambos procesos no sólo permite incrementar la productividad global, sino que reduce la Demanda Química de Oxígeno (DQO) de los efluentes de fermentación oscura (Chen et al., 2008b).

1.4 Metabolismo de las bacterias PNS

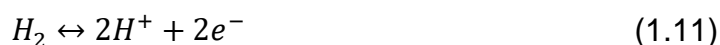
Las bacterias PNS son un grupo de bacterias fotosintéticas gram-negativas que tienen la capacidad de convertir la energía lumínica en energía química por fotosíntesis anoxigénica. El grupo incluye géneros como *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas* y *Rhodospirillum*, los cuales poseen versatilidad metabólica y pueden crecer en fotoheterotrofia con CO₂ o una fuente de carbono orgánico, en oscuridad por respiración, fermentación o bien en quimiolitotrofia (Maldigan and

Jung, 2009). Esta versatilidad metabólica les permite degradar diferentes sustratos, incluyendo ácidos orgánicos, azúcares, alcoholes e incluso compuestos aromáticos (Sasikala and Ramana, 1997). La producción de H₂ ocurre principalmente, por fotofermentación usando ácidos orgánicos o azúcares (Lo et al., 2011; Han et al., 2012), aunque se ha reportado que *Rhodospirillum rubrum* puede producirlo por fermentación oscura usando piruvato (Gorrell and Uffen, 1977) y fructosa (Schultz and Weaver, 1982); *Rhodopseudomonas capsulata* usando fructosa (Schultz and Weaver, 1982) y *Rubrivivax gelatinosus*, *Rhodopseudomonas palustris* y *R. rubrum* usando CO y H₂O (*water-gas shift reaction*) (Klasson et al., 1993; Maness et al., 2005; Oh et al., 2005; Pakpour et al., 2014).

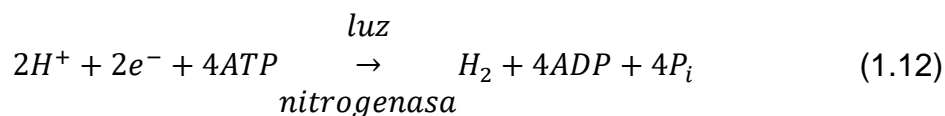
Las bacterias PNS, a diferencia de las algas y cianobacterias, poseen sólo un fotosistema (fotosistema II, PSII). Estas absorben luz a una longitud de onda mayor que las cianobacterias, por lo tanto, producen menos energía (Sasikala and Ramana, 1997). El PSII no es capaz de reducir ferredoxina, pero puede obtener ATP por flujo cíclico de electrones (Dasgupta et al., 2010). La falta del segundo fotosistema, no le permite separar las moléculas de agua, por lo que requieren sustratos más reducidos como donadores de electrones (Sasikala et al., 1993; Akkerman et al., 2002). Por lo anterior, no se produce oxígeno durante el proceso (fotosíntesis anoxigénica). Los principales pigmentos en el PSII son las bacterioclorofilas (absorbiendo a 590, 805, 855 y 875 nm) y carotenoides (absorbiendo a 450, 477 y 510 nm). Las condiciones ambientales pueden determinar la síntesis y composición de los pigmentos. Los factores más importantes son las condiciones de iluminación y el oxígeno (Cohen-Bazire et al., 1957).

Dos enzimas se relacionan con la producción de H₂ en las bacterias PNS: la hidrogenasa y la nitrogenasa. Aunque la hidrogenasa es responsable de la producción de H₂ en la fermentación oscura (Hallenbeck et al., 2012), en el caso de las bacterias PNS la hidrogenasa puede funcionar de forma bidireccional,

catalizando la producción o el consumo de H₂. Se ha observado que la producción de H₂ por la hidrogenasa es despreciable (Koku et al., 2002). En general, en el caso de la hidrogenasa de las bacterias PNS, el H₂ funciona como donador de electrones, sirviendo como un sustrato, catalizando la reacción de consumo de H₂ (1.11) (Basak and Das, 2007). Por lo anterior, en el caso del proceso fotofermentativo, la presencia de hidrogenasas activas es considerado como un antagonista en la producción de H₂ (Ghosh et al., 2017). La remoción continua del H₂ producido en el proceso (mantenimiento de presiones parciales bajas), puede limitar la actividad de esta enzima (Basak et al., 2014).



Debido a esto, la producción de H₂ por fotofermentación es atribuida a la nitrogenasa. La reacción primordial de esta enzima es la fijación de nitrógeno; sin embargo, en ausencia de N₂ molecular, ésta cataliza la producción de H₂ de acuerdo con la siguiente reacción (Koku et al., 2002):



La síntesis de la enzima requiere la presencia de luz y es directamente proporcional a la intensidad luminosa, hasta cierto nivel, en el cual se presenta inhibición (Meyer et al., 1978; Koku et al., 2002). Se ha observado que ciclos de luz/oscuridad pueden conducir a una actividad de la nitrogenasa más estable (Akkerman et al., 2002). La presencia de molibdeno y hierro en el medio favorece la síntesis y actividad de la enzima (Kim et al., 1980; Koku et al., 2002; Kars et al., 2006)

Por otro lado, la producción de H₂ requiere grandes cantidades de energía en forma de electrones y ATP (4 ATP/H₂) (Keskin et al., 2011). En anaerobiosis, el proceso fotofermentativo inicia con la oxidación del sustrato (azúcares y ácidos orgánicos) para el crecimiento celular a través de la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (Figura 1.1), donde también se produce CO₂ y NADH (Hallenbeck, 2013; Hay et al., 2013). El NADH se utiliza para reducir ferredoxina, el donador de electrones de la nitrogenasa, a través de un transporte reverso de electrones que ocurre durante fotosíntesis anoxigénica (Oh et al., 2011; Hallenbeck, 2013). Los electrones son transferidos a través de la ubiquinona al fotosistema. En el fotosistema la luz es colectada por dos complejos antena (central y periférico), canalizados dentro del centro de reacción, en el cual inicia el flujo cíclico de electrones. En el centro de reacción, un fotón estimula la excitación de la bacterioclorofila y la energía producida permite la liberación de un electrón, el cual

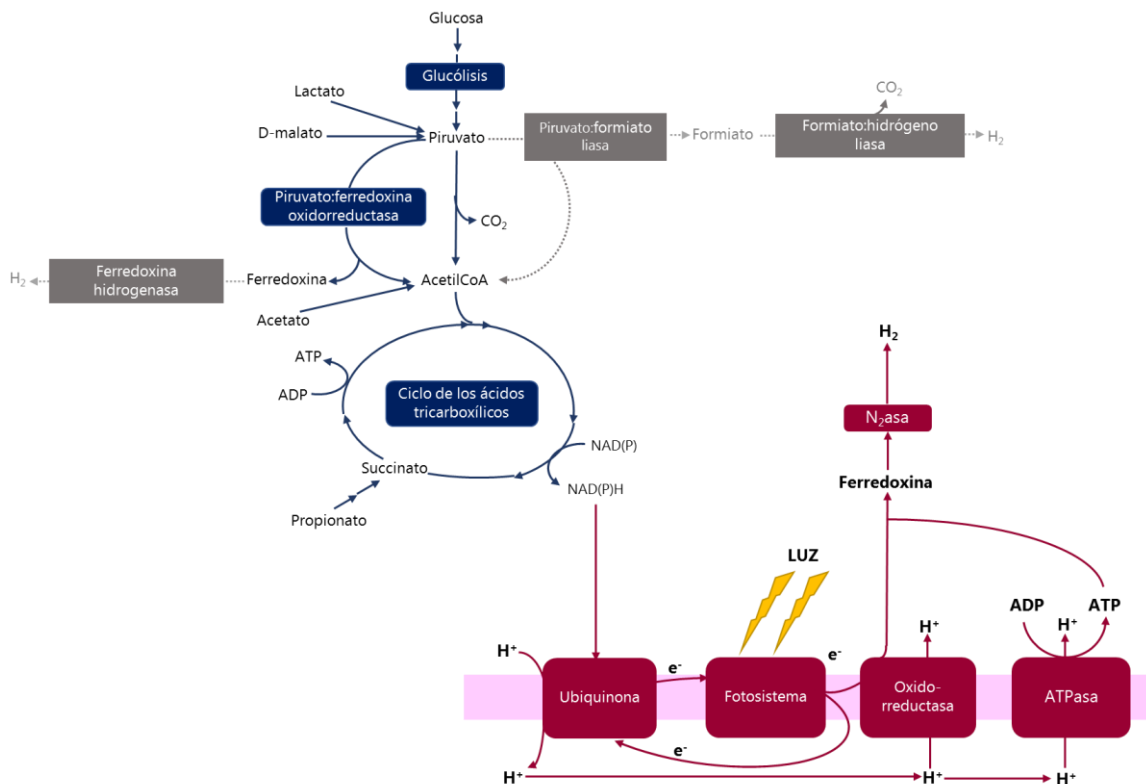


Figura 1.1. Diagrama de la ruta metabólica para la producción de H₂ por fotofermentación a partir de azúcares y ácidos orgánicos. Las rutas alternas para la producción de H₂ por fermentación oscura se marcan con líneas punteadas. Tomado de Oh et al. (2011)

reduce la reserva de quinonas de la membrana. Durante este proceso se liberan protones al espacio periplásmico, generando un gradiente electroquímico que permite la generación de ATP. Este gradiente de protones también promueve la transferencia de electrones a la ferredoxina (usando NADH). Finalmente, en ausencia de nitrógeno molecular, el ATP y la ferredoxina son usados en la generación de H₂ por acción de la nitrogenasa (McKinlay and Harwood, 2010a; Keskin et al., 2011; Oh et al., 2011). La producción de H₂ catalizada por la nitrogenasa es irreversible (Das and Veziroğlu, 2001). La síntesis de polihidroxibutirato (PHB) y la fijación de CO₂ son rutas metabólicas que pueden competir por los electrones, afectando la producción de H₂ (Keskin et al., 2011; Ghosh et al., 2017).

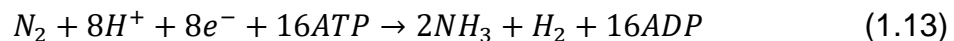
1.4.1 Inhibidores de la nitrogenasa

El principal inhibidor de la nitrogenasa es el oxígeno, la inhibición puede ocurrir a nivel genético evitando la síntesis de la enzima o a nivel enzimático afectando la actividad, en este último caso la inhibición es reversible (Akköse et al., 2009). Sin embargo, debido a que no se produce O₂ durante el proceso, este tipo de inhibición no suele representar problemas (Akkerman et al., 2002). Concentraciones menores al 20% de oxígeno en argón suelen ser inhibitorias (Sasikala et al., 1993). La presencia de oxígeno puede favorecer otro tipo de metabolismo (aerobio sin requerimiento de iluminación), por lo que no necesariamente afecta el crecimiento. Bajo estas condiciones, la tolerancia al oxígeno depende de la especie microbiana (Madigan and Jung, 2009).

El segundo inhibidor, es el amonio, cuyas sales suelen utilizarse como fuente de nitrógeno en los cultivos. La inhibición se debe a que el nitrógeno y el amonio son los principales reguladores de la síntesis y actividad de la enzima, debido a que su principal función es la fijación de nitrógeno. En presencia de amonio, las células reconocen que no existe necesidad de fijar nitrógeno, deteniendo la síntesis de la

enzima (Lehman and Roberts, 1991). La inhibición se ha observado aun en concentraciones menores a 20 μM (Zumft and Castillo, 1978; Koku et al., 2002). Lo anterior representa una limitante cuando se utilizan como sustrato aguas residuales (Zheng et al., 2009). La inhibición no altera la estructura de la enzima, por lo que es reversible. Se ha observado que los microorganismos suelen utilizar el amonio presente en el medio para crecimiento, hasta que este decrece por debajo del umbral de inhibición, después de lo cual la actividad de la enzima es recuperada y se reinicia la producción de H_2 (Sweet and Burris, 1981; Adessi et al., 2017).

El N_2 molecular, principal sustrato de la nitrogenasa también inhibe la producción de H_2 , mas no la síntesis o actividad de la enzima. En presencia de N_2 , se favorecen las reacciones de fijación de éste (1.13). Aunque se produce H_2 durante la fijación de N_2 , la cantidad es insignificante (1 mol H_2 /mol N_2 fijado) y demanda una mayor cantidad de ATP (Koku et al., 2002; McKinlay and Harwood, 2010a).



Sin embargo, se ha reportado que cuando la producción de H_2 se realiza en una atmósfera de N_2 , sin la adición de otra fuente de N en el medio, no suele presentarse inhibición (Ooshima et al., 1998). Otros compuestos nitrogenados en el medio también inhiben la síntesis de la enzima (urea, glutamina y asparagina) (Zumft and Castillo, 1978). Por lo que la selección de la fuente de nitrógeno juega un papel importante en el proceso fotofermentativo.

1.5 Factores que afectan el proceso fotofermentativo

La producción de H_2 por fotofermentación está influenciada por diversos factores. Koku et al. (2002) establecen que para maximizar la producción de H_2 , se requieren las siguientes condiciones:

- Actividad máxima de la nitrogenasa y mínima actividad de la hidrogenasa.
- Uso de sustratos más favorables para la producción de H₂ y menos favorables para la formación de otros productos.
- Relación favorable de C/N.
- Disponibilidad de luz, distribuida con intensidad uniforme a través del cultivo.
- Ausencia de modos de crecimiento alternativos como fermentación anaerobia.
- Optimización de otros factores, entre ellos, la edad del cultivo.

1.5.1 Inóculo

Las bacterias PNS representan un grupo ampliamente distribuido que pueden ser aisladas de distintos ambientes, principalmente acuáticos (Sasikala et al., 1993). Aunque se han identificado más de 20 géneros de bacterias PNS (Imhoff, 2008), las especies microbianas que se han utilizado para la producción de H₂, generalmente, pertenecen a los géneros *Rhodobacter* (*R. sphaeroides* y *R. capsulatus*), *Rhodovulum* (*R. sulfidophilus*), *Rhodopseudomonas* (*R. palustris*, *R. capsulata* y *R. faecalis*) y *Rhodospirillum* (*R. rubrum*) (Adessi et al., 2017)

Aunque la especie microbiana puede influir tanto en la conversión del sustrato como en la producción de H₂ (Hallenbeck, 2013), se ha observado que la edad del cultivo representa otro factor importante. Se ha reportado que las bacterias cosechadas a la mitad de la fase exponencial son más eficientes en la producción de H₂ que aquellas cosechadas en la fase estacionaria (Koku et al., 2003; Liu et al., 2015). Liu et al. (2015), observaron que inóculos cosechados a las 14 h permitían mejorar la producción de H₂, mientras que Mirza et al. (2013), reportan una edad del cultivo óptima de 48 h. Se cree que, al utilizar inóculos de mayor edad, estos podrían estar mejor adaptados hacia otras rutas metabólicas (Koku et al., 2003), como la producción de PHB. Además, ya que el H₂ es un producto parcialmente asociado al crecimiento, una disminución en la concentración o velocidad de

crecimiento celular afecta la producción de H₂ (Eroglu et al., 1999; Basak and Das, 2009).

La concentración inicial del inóculo (X_0) es otro factor que considerar. Una alta concentración celular lleva a decrecer la relación (S_0/X_0) lo que puede hacer que la cantidad de sustrato sea insuficiente para soportar el crecimiento celular. Además, altas concentraciones celulares pueden afectar la penetración de la luz en el sistema (Kim et al., 2012). En contraste, si la concentración celular es baja, gran parte del sustrato se usará para crecimiento microbiano, lo que también afectará la producción de H₂ (Xie et al., 2014).

Diversos autores han evaluado el efecto de la concentración del inóculo en la producción de H₂ reportando como valores adecuados 0.20 g SSV/L (Lazaro et al., 2015), 0.27 g SSV/L (Akman et al., 2015), 0.36 g SST/L (Seifert et al., 2010), 0.56 g SST/L (Kim et al., 2012), 0.70 g SST/L (Oh et al., 2004) y 0.77 g SST/L (Shi and Yu, 2005). Las relaciones S_0/X_0 reportadas son 4 (Shi and Yu, 2005), 6 (Kim et al., 2012), 8 (Akman et al., 2015) y 10 (Lazaro et al., 2015).

1.5.1.1 Cepas modificadas genéticamente

Debido a la versatilidad metabólica de las bacterias PNS existen otras rutas que pueden competir con la producción de H₂, por lo que se ha evaluado el uso de cepas modificadas genéticamente. En las bacterias PNS, las modificaciones genéticas consisten en la inactivación de los genes que codifican la síntesis de la hidrogenasa que consume H₂ (gen *hupSL*) (Ooshima et al., 1998; Kars et al., 2008; Wang et al., 2014b), gen que regula la síntesis de PHB (*phbC*) (Yilmaz et al., 2010; Kim et al., 2011; Ghosh et al., 2017), los genes relacionados con el complejo antena (genes *puhA*, *pufBA*, *pucBAC*) responsables de la generación de ATP (Kondo et al., 2002; Kim et al., 2006a) y los genes que regulan la síntesis y estabilidad de la nitrogenasa,

mejorando la tolerancia al amonio y oxígeno (*nifA*, *nifL* y *anfA*) (Wang et al., 2010a, 2016; Wu et al., 2016a).

El uso de las cepas modificadas ha logrado incrementar la producción de H₂ hasta más del doble, al compararlas con las cepas silvestres. Kim et al. (2006b) evaluaron el uso de una cepa de *R. sphaeroides* con doble mutación (genes *hup* y *phb*) logrando incrementar más de 2.5 veces la producción de H₂ a partir de malato. Usando cepas modificadas se han logrado alcanzar velocidades de producción de H₂ incluso superiores a 100 mL/Lh (Lee et al., 2002). Sin embargo, aunque el uso de cepas mutadas ha sido evaluado incluso en reactores a escala piloto (Boran et al., 2012), la principal limitante es el requerimiento de condiciones estériles, lo que puede resultar impráctico a nivel industrial.

1.5.1.2 Consorcios microbianos

La mayor parte de los estudios para producción de bio-H₂ se han realizado con cultivos puros, que requieren esterilización, lo que representa un costo extra (Fang et al., 2005). El uso de consorcios microbianos ofrece la posibilidad de tener procesos más prácticos, fáciles de operar y controlar. Además, estos pueden ser empleados para la producción de H₂ con sustratos mixtos (Li et al., 2008; Cardeña et al., 2015; Lazaro et al., 2015), incluyendo efluentes de fermentación oscura (Tawfik et al., 2014). La Tabla 1.3 muestra algunos estudios realizados con consorcios microbianos. Una de las desventajas del uso de consorcios, es la posibilidad de que en estos se encuentren microorganismos que compitan por el sustrato sin ser productores de H₂ o que consuman el H₂ producido (Wang and Wan, 2009b), lo que puede conducir a bajas velocidades de producción de H₂ (Lazaro et al., 2012; Loss et al., 2013). En el estudio realizado por Lazaro et al. (2012), con un consorcio microbiano formado por bacterias de los géneros *Rhodobacter*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* y *Sulfurospirillum* en el que probaron diferentes fuentes de carbono, las bajas velocidades de producción

Tabla 1.3. Uso de consorcios microbianos para la producción de H₂ por fotofermentación

Consortio	Sustrato	Operación	R _{H2} (mL/L/h)	ΔDQO (%)	Referencia
<i>Rhodopseudomonas sp.</i> y <i>Rhodobacter sp.</i>	Glucosa	Lote	136	99	(Chen et al., 2017)
<i>Rhodobacter</i> , <i>Rhodospirillum</i> , <i>Rhodopseudomonas</i> y <i>Sulfurospirillum</i>	Acetato y butirato	Lote	24.5	95	(Lazaro et al., 2015)
<i>R. palustris</i> (57% de las clonas)	Acetato, propionato y butirato	Lote	6.1	70	(Cardeña et al., 2015)
<i>R. palustris</i> y <i>Rhodobacter sp.</i>	Efluente de fermentación oscura: acetato, lactato, butirato y propionato	Continuo	121	86	(Tawfik et al., 2014)
Aislado del sedimento de una laguna brasileña. No caracterizado	Acetato Butirato	Lote	0.60 0.56	-	(Loss et al., 2013)
<i>Rhodobacter</i> , <i>Rhodospirillum</i> , <i>Rhodopseudomonas</i> y <i>Sulfurospirillum</i>	Malato Butirato Acetato	Lote	1.0 0.9 0.4	- - -	(Lazaro et al., 2012)
<i>Ectothiorhodospira shaposhnikovii</i> , <i>Sporolactobacillus nakayamae</i> y <i>Rhodovulum sulphidophilum</i>	Butirato	Lote	10.4	-	(Cai et al., 2012)
<i>Rhodobacter sp.</i> , <i>R. sphaeroides</i> y <i>Rubrivivax gelatinosus</i>	Acetato y butirato	Continuo Lote	8.0 5.1	- 43.4	(Li et al., 2008)
<i>R. capsulatus</i> (80%)	Acetato Butirato	Lote	8.80 12.8	- -	(Fang et al., 2005)

de H₂ alcanzadas fueron atribuidas a una baja proporción de bacterias fototróficas en el consorcio (un tercio de las clonas analizadas) y a la presencia de microorganismos que pueden competir por el sustrato y consumir el H₂ producido (*Sulfospirillum*). Sin embargo, un estudio posterior (Lazaro et al., 2015) en el que se evaluó el efecto de otras variables sobre la producción de H₂ (concentración del inóculo, pH, intensidad luminosa y protocolo de iluminación), permitió incrementar la producción de H₂ con el mismo consorcio. Algunos estudios con consorcios microbianos han permitido obtener velocidades de producción incluso mayores a las obtenidas con cultivos puros o modificados genéticamente (Tawfik et al., 2014; Chen et al., 2017). Lo anterior indica que, bajo las condiciones de cultivo adecuadas, los consorcios microbianos son una alternativa viable para la producción de H₂.

1.5.2 Sustrato

Una de las ventajas del uso de bacterias PNS para la producción de H₂ es la capacidad que tienen para usar diversos sustratos como fuente de carbono para la producción de H₂, principalmente carbohidratos como glucosa, xilosa, arabinosa, fructosa, maltosa, sacarosa y celobiosa (Ooshima et al., 1998; Laocharoen and Reungsang, 2014; Subudhi et al., 2016); ácidos orgánicos dentro de los que se encuentran acetato, propionato, butirato, lactato, malato, succinato, citrato, ácido pirúvico, isovalérico e isobutírico (Tao et al., 2008; Lazaro et al., 2012) y alcoholes como etanol y manitol (Han et al., 2012; Laocharoen and Reungsang, 2014).

Hay dos parámetros que generalmente se usan para evaluar la producción de H₂ a partir de un sustrato específico. El primero, la velocidad de producción de H₂ (R_{H_2}) (mol o L H₂/Lh y mol o L H₂/hg-biomasa). El segundo, la eficiencia en la conversión de sustrato (Y_{H_2}), que es la relación (expresada en porcentaje) entre los moles de H₂ producidos y los que teóricamente es posible obtener a partir de un sustrato (Tabla 1.4), si todo se utilizara en la producción de H₂ de acuerdo a la reacción hipotética (1.14) (Koku et al., 2002).

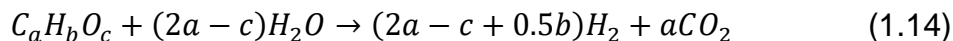


Tabla 1.4. Conversión teórica de distintas fuentes de carbono a H₂.

Fuente de Carbono (FC)	mol H ₂ /mol FC	Fuente de Carbono (FC)	mol H ₂ /mol FC
Ácido acético (C ₂ H ₄ O ₂)	4	Ácido pirúvico (C ₃ H ₄ O ₃)	5
Ácido propiónico (C ₃ H ₆ O ₂)	7	Ácido láctico (C ₃ H ₆ O ₃)	6
Ácido butírico (C ₄ H ₈ O ₂)	10	Sacarosa (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	24
Ácido málico (C ₄ H ₆ O ₅)	6	Fructosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	12
Ácido láctico (C ₃ H ₆ O ₃)	6	Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	12
Ácido succínico (C ₄ H ₄ O ₄)	6	Etanol (C ₂ H ₆ O)	6

En general, las eficiencias de conversión cuando se utilizan carbohidratos suelen ser bajas en comparación a las logradas con ácidos orgánicos de cadena corta (Tao et al., 2008; Subudhi et al., 2016), aunque las velocidades de producción suelen ser similares. El estudio del genoma de *R. palustris* reveló que esta bacteria tiene poca capacidad para crecer en azúcares debido a que carece de transportadores de glucosa y fructosa o de un gen hexoquinasa (Larimer et al., 2004). Sin embargo, esta especie ha mostrado capacidad para crecer y producir H₂ a partir de compuestos aromáticos (benzoato y mandelato) (Fißler et al., 1994), aunque las conversiones también son bajas. Otro estudio mostró que la presencia de algunos compuestos heterocíclicos aromáticos (metilpiridina y pirazina), puede favorecer la producción de H₂ al incrementar la actividad enzimática (Archana et al., 2003).

Los sustratos preferidos para la producción de H₂ son los ácidos grasos de cadena corta o ácidos grasos volátiles (AGV's), entre ellos acetato, butirato y propionato (Loss et al., 2013; Cardeña et al., 2015), los cuales suelen estar presentes en efluentes de fermentación oscura (Lo et al., 2011; Tawfik et al., 2014). Aunque se han obtenido altas velocidades de producción y eficiencias de conversión a partir de estos AGV's (Ren et al., 2009a; Lo et al., 2011), se ha reportado que los ácidos dicarboxílicos como malato y succinato suelen ser más apropiados que

acetato y butirato. Esto se debe a que la energía requerida para la formación de H₂ es más fácilmente obtenida de estos ácidos debido a que entran directamente al metabolismo de los TCA, mientras que el acetato y el butirato deben primero ser convertidos a acetil-CoA. Además, el uso de acetato como fuente de carbono también está asociado a la producción de PHB, compitiendo con la producción de H₂ (Kim et al., 2012; Cardeña et al., 2017).

En un estudio con una cepa de *R. sphaeroides*, Tao et al. (2008) encontraron conversiones del 54 y 63% para glucosa y manitol, y velocidades de producción de 75 mL H₂/Lh para ambas fuentes de carbono. Sin embargo, usando butirato lograron una conversión del 72% y una velocidad de 118 mL/Lh. Aunque la velocidad obtenida con malato fue similar (108 mL/Lh), la eficiencia de conversión fue del 83% y usando succinato del 89%. Resultados similares fueron encontrados en otro estudio usando también una cepa de *R. sphaeroides* (Han et al., 2012), en el que las conversiones más bajas fueron obtenidas con glucosa (0.004%) y etanol (0.006%), seguidas por butirato (2.4%), acetato (4.10%), propionato (6.10%) y finalmente lactato (14.2%) y malato (22.3%).

No obstante, la eficiencia de conversión y velocidad de producción de H₂ depende de la cepa usada en el proceso fotofermentativo. Estudios realizados con *R. faecalis* mostraron que al usar acetato para la producción de H₂ se lograban mejores resultados que con malato (Ren et al., 2009a). En el caso de *Rubrivivax gelatinosus*, se ha observado que éste no produce H₂ cuando se usan acetato y butirato como fuentes de carbono únicas (Wu et al., 2010; Yang et al., 2012). Sin embargo, fue posible producirlo cuando se utilizó glucosa, alcanzando una velocidad de 32 mL/Lh y una eficiencia de conversión del 51% (Yang et al., 2012).

Algunos estudios han mencionado que al utilizar más de una fuente de carbono (fuentes de carbono mixtas), la producción de H₂ puede ser mejorada si estos se encuentran en las concentraciones adecuadas (Han et al., 2012; Wang et

al., 2014a). Yang et al. (2012) reportaron que aun cuando *R. gelatinosus* no utilizó acetato y butirato para producir H₂ cuando se usaron como fuente de carbono únicas; al utilizarlos en combinación con glucosa, la eficiencia de conversión de ésta incrementó. Lo anterior indicó que, al agregar acetato o butirato estos pueden ser usados para crecimiento y una mayor cantidad de glucosa puede emplearse en la producción de biogás. Además, la combinación de carbohidratos con ácidos grasos puede ayudar a regular el pH, lo que resulta beneficioso para el proceso. Por otro lado, Wu et al., (2010) consideran que *R. gelatinosus* puede utilizar acetato y butirato para producción de H₂ cuando están como fuentes de carbono mixtas y que el hecho de que no se produzca H₂ con acetato y butirato al utilizarlos como única fuente de carbono puede estar asociado a otros factores, como la regulación del pH.

La concentración adecuada de la fuente de carbono también determina la producción de biogás. Si el sustrato se encuentra en baja concentración, éste puede no ser suficiente para soportar el crecimiento y la producción simultánea de H₂ (Wang et al., 2014a), mientras que concentraciones elevadas pueden decrecer la producción, lo que se asocia a inhibición por sustrato, producto o cambios en el pH durante el proceso (Subudhi et al., 2016). La concentración de sustrato óptima para el proceso fotofermentativo dependerá de la fuente de carbono, la cepa utilizada y de la optimización de otras variables en el sistema. En el estudio realizado por Wang et al. (2014a) con un consorcio compuesto por bacterias del género *Rhodopseudomonas* se observó que la concentración óptima de acetato para la producción de H₂ era 60 mM (3.6 g/L). La concentración reportada como óptima con *R. sphaeroides* por Han et al. (2012) para el mismo sustrato, fue alrededor de cuatro veces menor 14 mM (0.9 g/L) y la inhibición fue significativa a concentraciones superiores a 1.8 g/L. En el caso de propionato, generalmente se reportan concentraciones más bajas, 4 mM (0.3 g/L) con inhibición significativa a partir de 17 mM (1.2 g/L) (Han et al., 2012). Usando acetato, propionato y butirato como fuentes de carbono mixtas, con bacterias del género *Rhodopseudomonas* se encontraron concentraciones óptimas de 1.8, 1.1 y 0.4 g/L (Wang et al., 2014a), mientras que

con otro consorcio formado principalmente por *R. palustris*, las concentraciones óptimas fueron 1.2, 0.7 y 1.6 g/L para acetato, propionato y butirato, respectivamente (Cardeña et al., 2015).

1.5.2.1 Fuente de Nitrógeno

Aunque la producción de H₂ ocurre principalmente en ausencia de nitrógeno, este tiene un papel importante en el crecimiento celular (Akköse et al., 2009). Diversos estudios han evaluado el efecto de la fuente de N sobre la producción de H₂, incluyendo aminoácidos (Hillmer and Gest, 1977; Fißler et al., 1994; Gabrielyan et al., 2010), sales de amonio (Oh et al., 2004; Yang et al., 2012), etanolamina (Tao et al., 2008), urea (Merugu et al., 2012) y otros (Oh et al., 2004; Ren et al., 2009a; Laocharoen and Reungsang, 2014). Se ha observado que las fuentes de nitrógeno orgánicas permiten una mayor producción de H₂ que las inorgánicas debido a que las primeras pueden ser directamente incorporadas a las proteínas o transformadas en otros componentes celulares nitrogenados (Merugu et al., 2012). En la mayor parte de los estudios se ha concluido que el glutamato es la fuente de nitrógeno más adecuada para la producción de H₂ al maximizar tanto la velocidad de producción como la cantidad de H₂ producido (Fißler et al., 1994; Ooshima et al., 1998; Kim et al., 2012; Assawamongkholsiri and Reungsang, 2015). Sin embargo, la principal desventaja del glutamato es el costo, por lo que se han buscado fuentes más económicas. Un estudio (Laocharoen and Reungsang, 2014) evaluó el uso del desecho de la cristalización del glutamato monosódico (Aji-L), cuya composición principal sigue siendo glutamato, como una fuente de nitrógeno más económica. El estudio mostró que las producciones con Aji-L y glutamato eran similares. La etanolamina (Ooshima et al., 1998; Tao et al., 2008) también se ha sugerido como fuente de N alternativa con producciones cercanas a las alcanzadas con glutamato.

El amonio es considerado un inhibidor de la enzima nitrogenasa. Sin embargo, en procesos acoplados de fermentación oscura y fotofermentación, es

importante considerar que la mayoría de los efluentes de fermentación oscura contienen amonio (Akköse et al., 2009). Se ha observado que es posible utilizar sales de amonio como fuente de N si se mantiene en la concentración adecuada en el medio. Kim et al. (2012) evaluaron el uso de amonio en un medio con 30 mM de succinato, concluyendo que a concentraciones por debajo de 4 mM (56 mg/L de N) era posible obtener altas producciones de H₂. El estudio también mostró que la producción de H₂ inicia una vez que el nitrógeno es asimilado para crecimiento celular, caso contrario a lo sucedido con el uso de glutamato, en el que a concentraciones por debajo de 16 mM (224 mg/L) no se observó fase de latencia. Sin embargo, como parte de la asimilación del glutamato, se observó la formación de amonio tras 24 h de cultivo lo que disminuyó la producción de H₂. En otro estudio realizado con 15 mM de malato (Akköse et al., 2009), se reportó que concentraciones por encima de 2 mM de amonio (28 mg/L de N) eran inhibitorias para la producción de H₂. Ooshima et al. (Ooshima et al., 1998) concluyeron que utilizar amonio en concentraciones menores a 3.5 mM (49 mg/L N) en un medio con 30 mM de malato es adecuado para la fotofermentación. Ellos también observaron que incluso es posible utilizar N₂ gaseoso (considerado también como inhibitorio al favorecer la reacción de fijación de N₂), si no se adiciona otra fuente de N en el medio. La concentración de N₂ dependerá de la solubilidad del gas en el medio a las condiciones de cultivo.

También se ha observado que la producción de H₂ puede ocurrir en ausencia de una fuente de N (Oh et al., 2004; Kim et al., 2012). En estas condiciones se requiere que se inicie con una concentración adecuada de inóculo, ya que sin N no se presenta crecimiento microbiano. El bloquear la reproducción celular puede favorecer el proceso al utilizar una mayor cantidad de sustrato y energía en la producción de H₂ (Oh et al., 2004; McKinlay et al., 2014). Estos resultados también muestran la estabilidad del sistema fotosintético en anaerobiosis, al mantenerse la producción de H₂ por un largo tiempo sin necesidad de nitrógeno para síntesis celular (Oh et al., 2004).

1.5.2.2 Relación C/N

La relación C/N es importante para reducir la producción de NH_4^+ . Hillmer and Gest (1977), evaluaron tres diferentes relaciones C/N comprendidas entre 1.7 y 5 y observaron que al aumentar esta relación la producción de amonio decrecía. Éste y otros estudios han mostrado que mantener altas relaciones C/N incrementa la producción de H_2 . Kim et al. (2012) determinaron que una relación C/N = 7.5 era la más adecuada para la producción de H_2 con succinato y amonio, similar a la reportada para un medio de malato con glutamato (C/N entre 7 y 8) en un proceso con biomasa inmovilizada (Planchard et al., 1989). Usando acetato y glutamato, Akköse et al. (2009) observaron que una relación C/N de 35 incrementaba la producción; mientras que usando malato y amonio los mejores resultados se lograron con una relación C/N de 60. Cuando se usó un efluente de fermentación oscura, se encontró que una relación $\text{DQO}_t/\text{NH}_4\text{-N}$ entre 8.8 y 12.8 y concentraciones de amonio de 42.7 a 62.7 mg/L eran adecuadas para la producción de H_2 (Tawfik et al., 2014). En un sistema operando como lote alimentado (Androga et al., 2011a), se observó que una relación C/N = 25 con acetato y glutamato no sólo permitía incrementar la producción de H_2 , sino que permitió mantener una producción estable durante 20 días de operación del reactor.

1.5.3 Temperatura y pH

La temperatura del cultivo tiene un efecto sobre el funcionamiento de las proteínas celulares y la actividad de la enzima (Laocharoen and Reungsang, 2014). Las bacterias fotosintéticas están clasificadas como microorganismos mesófilicos cuyo crecimiento puede detenerse por encima de 39-45°C, dependiendo de la especie microbiana (Androga et al., 2016). Las altas temperaturas pueden conducir a desnaturalización de proteínas celulares, inactivación irreversible de enzimas y estrés celular. Como resultado, la producción de H_2 se verá afectada, ya que las células priorizarán las actividades metabólicas relacionadas con la supervivencia

(Androga et al., 2014). Por otro lado, se considera que las bajas temperaturas afectan la fluidez de la membrana celular, el plegamiento de proteínas y las funciones ribosomales (Phadtare, 2004).

Se ha observado que temperaturas cercanas a 30°C suelen ser adecuadas para el crecimiento y producción de H₂ de las bacterias PNS (Hay *et al.*, 2013), lo que se relaciona con la temperatura óptima para la nitrogenasa (Koku et al., 2002). Esta temperatura (30°C) fue reportada como óptima para la fotoproducción de H₂ con un consorcio microbiano a partir de butirato (Cai et al., 2012), *R. palustris* a partir de glucosa y con *R. sphaeroides* a partir de malato (Laocharoen and Reungsang, 2014). Estos últimos también observaron que una temperatura de 45 °C detuvo completamente la producción. Con *R. capsulatus*, Androga et al., (2014) encontraron que una temperatura alrededor de 27°C permitía maximizar tanto la velocidad de producción de H₂ como la conversión del sustrato.

Chen et al. (2017) evaluaron temperaturas de cultivo entre 30 y 50°C con un consorcio formado por fotobacterias de los géneros *Rhodobacter* y *Rhodopseudomonas*, una temperatura de 35°C favoreció la producción de H₂. Ellos observaron que la producción de H₂ no decaía significativamente al incrementarse la temperatura hasta 40°C y que aún a 45°C las bacterias podían producir H₂, aunque con menor eficiencia. La tolerancia a la temperatura del consorcio evaluado fue mayor a la reportada por otros autores con cultivos puros. Assawamongkhol Siri y Reungsang, (2015) reportaron una temperatura óptima de 25.6°C para *R. sphaeroides* y observaron una disminución en la producción de H₂ por encima de los 26°C, un rango mucho menor al reportado por Chen et al., (2017).

La resistencia a un intervalo más amplio de temperaturas es importante, sobre todo en sistemas operando con luz solar, donde las fluctuaciones de la temperatura pueden conducir a bajas productividades y donde el control de la

temperatura puede resultar complicado o costoso principalmente a gran escala (Boran et al., 2010; Avcioglu et al., 2011; Kayahan et al., 2017).

El pH del medio afecta la actividad enzimática y la ruta metabólica de las bacterias fotosintéticas al determinar la forma iónica de los sitios activos de las enzimas (Laocharoen and Reungsang, 2014; Lazaro et al., 2015). Las bacterias fotosintéticas suelen trabajar a pH cercanos a la neutralidad (Das and Veziroglu, 2008), que se relaciona con el pH óptimo de la nitrogenasa (Koku et al., 2002).

En experimentos conducidos para evaluar el efecto del pH inicial sobre la velocidad de producción de H_2 ($R_{m\acute{a}x}$), la máxima producción de H_2 ($H_{m\acute{a}x}$) y la conversión de sustrato, los mejores resultados suelen encontrarse en un intervalo de pH de 6.5 a 7.5. Esto incluye estudios con *R. sphaeroides* (Tao et al., 2008; Nath and Das, 2009; Kim et al., 2012; Assawamongkhol Siri and Reungsang, 2015) *R. palustris* (Tian et al., 2010; Zhang et al., 2010), *R. faecalis* (Ren et al., 2009a) y *R. gelatinosus* (Yang et al., 2012).

Se ha reportado también, que las células que crecen en pH alcalinos son capaces de adaptar el pH óptimo de sus nitrogenasas a un rango más alcalino (Tsygankov et al., 1997). En los estudios mencionados en el párrafo anterior, el pH al que fue cultivado el inóculo también estuvo alrededor de 7. Los experimentos realizados por Cai et al. (2012), para la producción de H_2 a partir de butirato con un consorcio microbiano, mostraron que un pH de 8 permitía obtener la máxima producción de H_2 y conversión de sustrato. A pH 9, la producción de H_2 fue similar. En este experimento, las células fueron pre-cultivadas a un pH de 8.

El pH óptimo también está relacionado con el sustrato utilizado en el proceso fotofermentativo. Para *R. sphaeroides* creciendo en glucosa y sacarosa, las mayores producciones se obtuvieron en el intervalo de pH 8 a 9, mientras que con acetato se observó que un pH de 8 era el más adecuado, con una disminución

significativa cuando el pH incrementó a 9 (Subudhi et al., 2016). Fang et al., (2005), usaron un consorcio microbiano compuesto primordialmente de *R. capsulatus* y encontraron que un pH inicial de 8.0 era adecuado para la conversión de acetato, mientras que, en el caso del butirato, un pH de 9.0 fue más adecuado.

Durante el proceso, el pH del medio se modifica como resultado del crecimiento microbiano y el metabolismo del sustrato. Cuando se usan ácidos grasos, al inicio el pH se incrementa debido al consumo de estos y a la liberación de iones OH⁻. Posteriormente, el pH vuelve a decaer, lo que se relaciona con la formación de productos finales de la fermentación (Gabrielyan et al., 2010). En especies de *R. sphaeroides* se ha observado que la alcalinización del medio durante el proceso afecta la actividad nitrogenasa, decrece la cantidad de H₂ producido e incrementa la de polihidroxibutirato (PHB) (Koku et al., 2002). El aumento del pH también está relacionado con la acumulación de iones amonio (Subudhi et al., 2016). Cuando se usan como sustrato azúcares, el pH suele disminuir debido a la formación de ácidos grasos (Yang et al., 2012). Los valores bajos de pH se relacionan con bajos niveles de ATP, lo que también impacta la producción de H₂ (Ren et al., 2009a).

Se ha observado que el controlar el pH durante el proceso permite mejorar la producción de H₂ (Seifert et al., 2010; Kim et al., 2012). Sin embargo, el estudio de Tao et al., (2008), con una cepa de *R. sphaeroides*, mostró que la variación en la producción de H₂ no era significativa en un intervalo de pH de 6 a 9 y que las bacterias eran capaces de autorregular el pH, llevándolo a un valor cercano a la neutralidad, cuando el pH inicial se encontraba entre 5.5 y 9.5. La autorregulación representa una ventaja, evitando sistemas de control de pH y, por lo tanto, costos de operación. Yang et al., (Yang et al., 2012) proponen que el uso de sustratos mixtos combinando carbohidratos y ácidos grasos puede ayudar a regular el pH del sistema.

1.5.4 Tipo de iluminación (Longitud de onda, λ)

La producción de H₂ es catalizada por la nitrogenasa, requiriendo ATP y poder reductor, los cuales son suministrados por el sistema fotosintético de las células (Kondo et al., 2002). La fotosíntesis también requiere la presencia de pigmentos, que en las bacterias PNS son los carotenoides (absorben entre 450 y 550 nm) y las bacterioclorofilas (absorben a 590, 800, 850 y 880 nm) (Ritchie, 2013; Adessi and De Piripis, 2014). Debido a estos pigmentos, las bacterias fotosintéticas pueden utilizar un amplio intervalo del espectro solar, 400-950 nm (Zhang et al., 2010). En general, son capaces de usar el 54% de la radiación total del espectro visible para la fotosíntesis (Basak and Das, 2009; Ritchie, 2013).

Las condiciones ambientales, principalmente la iluminación y el oxígeno, influyen en la composición de los pigmentos (Cohen-Bazire et al., 1957). Con base en su capacidad para sintetizar bacterioclorofilas, las bacterias PNS se pueden clasificar en dos grupos: 1) sintetizan bacterioclorofilas en luz y anaerobiosis, y sólo pueden sintetizar ciertas cantidades del pigmento en oscuridad con bajas concentraciones de oxígeno y 2) requieren luz para la síntesis, pero ésta puede llevarse a cabo en presencia o ausencia de oxígeno (Willows and Kriegel, 2009).

La fuente de luz para la producción de H₂ suele seleccionarse de modo que la longitud de onda a la que emite cubra los picos de absorción de los pigmentos. Las lámparas de tungsteno han sido las más utilizadas (Akroum-Amrouche et al., 2011; Subudhi et al., 2016; Elkahlout et al., 2017) debido a que su espectro de emisión abarca el espectro completo de absorción de los pigmentos fotosintéticos, favoreciendo la producción de H₂ (Adessi and De Philippis, 2014).

Uyar et al. (2007), diseñaron experimentos para evaluar el efecto de la longitud de onda sobre la producción de H₂, utilizando lámparas de tungsteno (λ de 370 a 1030 nm). Usaron dos soluciones como filtros ópticos para bloquear

determinadas partes del espectro: solución de Rodamina B (bloqueo de $\lambda > 760$ nm) y solución de CuSO_4 (bloqueo de $\lambda < 630$ nm). El bloqueo de $\lambda > 760$ nm disminuyó significativamente la producción de H_2 , mostrando la importancia de la luz infrarroja, donde la absorción de la bacterioclorofila es máxima. Por el contrario, la parte del espectro donde absorben los carotenoides no tuvo una influencia significativa en la producción de H_2 .

Otras fuentes de iluminación empleadas incluyen las lámparas de halógeno (Yang et al., 2012; Adessi et al., 2016), fluorescentes (Lazaro et al., 2012; Kao et al., 2016; Hay et al., 2017) y LED (Kawagoshi et al., 2010; Wang et al., 2010b). Usando un cultivo de *R. sphaeroides*, Argun y Kargi (2010b) probaron lámparas de tungsteno, fluorescentes, infrarrojas (IR), halógeno y la combinación de tungsteno + IR. Se produjo un mayor volumen de H_2 con las lámparas de halógeno seguida por la combinación tungsteno + IR. Sin embargo, la producción con las lámparas IR como fuente de iluminación única fue insignificante. Por otro lado, las velocidades de producción más altas se lograron con las lámparas de halógeno seguida de las lámparas fluorescentes.

Las lámparas LED (*light-emitting diode* o diodo emisor de luz) tienen como ventajas su larga vida útil y su bajo consumo energético; lo que puede reducir los costos de operación comparados con otras fuentes de luz artificial, principalmente tungsteno (Kawagoshi et al., 2010). Estas lámparas han sido utilizadas a longitudes de onda única (monocromáticas) a 470, 520, 590 y 630 nm (Liao et al., 2010; Wang et al., 2013) y como LED de onda larga (LW-LED, 770-920 nm con un máximo a 830 nm) (Kawagoshi et al., 2010). Estas lámparas también permiten una alta eficiencia fotoquímica (energía contenida en el H_2 producido por unidad de energía luminosa absorbida), al evitar la entrada de energía de longitudes de onda inactivas y tener una menor cantidad de energía disipada como calor (Tian et al., 2010; Adessi and De Philippis, 2014).

Usando LED monocromáticos, se ha observado que una $\lambda = 590$ nm suele ser la más apropiada al coincidir con uno de los picos de absorción de la bacterioclorofila (Tian et al., 2010; Zhang et al., 2010; Wang et al., 2013). Usando LW-LED se lograron producciones similares a las de un control iluminado con lámparas de tungsteno (Kawagoshi et al., 2010). Por otro lado, se ha reportado que las lámparas LED azules (470 nm) favorecen el crecimiento y la síntesis de pigmentos carotenoides en *R. palustris*, mientras que los LED rojos (630 nm) y amarillos (590 nm) no fueron adecuados para este fin (Kuo et al., 2012).

1.5.5 Intensidad luminosa

La intensidad luminosa controla la síntesis del aparato fotosintético (Laocharoen and Reungsang, 2014; Zhou et al., 2014). Si la intensidad luminosa es baja, se limita la generación de ATP y por tanto la producción de H_2 ; el sustrato podría usarse principalmente para crecimiento (Cai et al., 2012). Al incrementar la intensidad luminosa se provee más ATP y poder reductor para el proceso fotosintético (Laocharoen and Reungsang, 2014). La síntesis de la nitrogenasa también se favorece en estas condiciones (Meyer et al., 1978). Sin embargo, cuando esta incrementa demasiado, se presenta saturación (fotoinhibición), que se refiere a un suministro excesivo de ATP y Fd_{red} por parte del sistema fotosintético, en comparación con la capacidad de la nitrogenasa. El exceso de fotones se disipa como calor, conduciendo a daño celular (Akroum-Amrouche et al., 2011). La intensidad luminosa también influye en la síntesis de los pigmentos fotosintéticos. Cuando la intensidad luminosa incrementa, la concentración de los pigmentos puede disminuir (Meyer et al., 1978). Si la intensidad luminosa no es favorable, el proceso puede desviarse hacia la producción de PHB, debido a que ésta no se ve afectada por la intensidad luminosa. La actividad de la hidrogenasa puede incrementar con el incremento de la intensidad luminosa en mayor grado que la nitrogenasa, lo que también puede perjudicar la producción de H_2 a altas intensidades (Lee et al., 2002).

Un parámetro importante para evaluar la producción de H₂ es la eficiencia fotoquímica o eficiencia de conversión de luz (LCE, por sus siglas en inglés) Esta se refiere a la energía almacenada en el H₂ producido por unidad de energía lumínica absorbida (1.15):

$$LCE(\%) = \frac{33.61 \times \rho_{H_2} \times V_{H_2}}{I \times A \times t} \times 100 \quad (1.15)$$

donde 33.61 es el contenido energético del H₂ (Wh/g), ρ_{H_2} es su densidad (g/L), V_{H_2} es el volumen producido (L), I es la intensidad luminosa (W/m²), A es el área irradiada (m²) y t es la duración del proceso (h).

El cálculo sólo toma en cuenta la energía luminosa e ignora la cantidad de energía derivada del sustrato para la producción de H₂. Los resultados pueden ser complejos de comparar debido a diferencias en la forma de medir la intensidad luminosa (equipos de medición) y a si se toma en cuenta la luz suministrada al reactor o la luz absorbida por el sistema. A pesar de estas diferencias en los cálculos, la eficiencia fotoquímica puede ser útil para el diseño de reactores y en estudios donde se busca incrementar la eficiencia en la producción de H₂ (Adessi and De Philippis, 2014). La eficiencia fotoquímica suele disminuir a medida que la intensidad incrementa, como consecuencia de la saturación y debido a que el sistema fotosintético está mejor adaptado a condiciones de baja luminosidad (condiciones presentes en el medio ambiente) (Uyar et al., 2007; Akman et al., 2015).

Otro factor que afecta la producción de H₂ y disminuye la eficiencia fotoquímica es la obstrucción al paso de luz como resultado del crecimiento microbiano, la formación de biopelícula en la superficie del reactor y el exceso de pigmentos (*Shading effect* o efecto sombra), lo que limita la iluminación, sobre todo en las partes más profundas del reactor (Kondo et al., 2002; Li et al., 2009).

En la Tabla 1.5 se muestran las intensidades luminosas, producciones de H₂ y eficiencias fotoquímicas reportadas en la bibliografía con distintos tipos de iluminación. La mayoría de los estudios han reportado como intensidades óptimas, valores entre 100 y 300 W/m². Debido a que las bacterias PNS no son capaces de utilizar todo el espectro de iluminación, la eficiencia fotoquímica no puede alcanzar el 100%. Se ha estimado que el máximo teórico se encuentra alrededor del 10% (Akkerman et al., 2002). Sin embargo, como se observa en la tabla, existen reportes que mencionan eficiencias superiores (Tian et al., 2010; Wang et al., 2013). Aunque no se mencionan las consideraciones de los cálculos, se ha considerado que estos valores pueden deberse a una subestimación del área irradiada (Adessi and De Philippis, 2014), al tratarse de estudios con biomasa inmovilizada.

1.5.6 Protocolo de iluminación

Diversos estudios han evaluado el efecto de los ciclos luz/oscuridad, tratando de simular condiciones ambientales. Los estudios han mostrado que no existe producción de H₂ en los periodos de oscuridad (ya que la única forma de generar ATP es por fotosíntesis) y el crecimiento microbiano es mínimo o nulo, sin embargo, las bacterias consumen sustrato para mantenimiento celular. Las bacterias pueden sobrevivir con metabolismo fotofermentativo durante los periodos de oscuridad, lo que también es avalado por la disminución del pH en estos periodos. Debido al cambio de metabolismo en oscuridad, la fase de latencia es más larga. Aunque no se presenta producción en los periodos de oscuridad, las bacterias son capaces de sobrevivir y mantener su actividad; la producción de H₂ se recupera una vez que la iluminación se reinicia (Uyar et al., 2007; Eroglu et al., 2010; Lazaro et al., 2015).

Sin embargo, en cuanto a las productividades conseguidas y las velocidades alcanzadas al comparar el uso de iluminación continua contra ciclos luz/oscuridad, los resultados difieren. Algunos estudios mencionan que la velocidad promedio y la productividad total disminuyen, lo que relacionan con el consumo de sustrato en

Tabla 1.5. Tipo de iluminación, intensidades luminosas, producciones y eficiencias fotoquímicas reportadas en la bibliografía

Microorganismo	Sustrato	Proceso	Fuente de iluminación	Intensidad luminosa (W/m ²)	H (mL/L)	R _{H2} (mL/L/h)	LCE (%)	Referencia
<i>R. capsulata</i>	Acetato, propionato y butirato	Lote	Tungsteno	278*	2050	14.7**	4.2	(Shi and Yu, 2005)
<i>R. sphaeroides</i>	Malato	Lote	Tungsteno	277	800	34.0**	0.5	(Uyar et al., 2007)
<i>R. sphaeroides</i>	Malato	Lote	Fluorescente	15	754	6.5**	3.7	(Basak and Das, 2009)
<i>R. sphaeroides</i>	Efluente de fermentación de almidón (AGV's)	Lote	Halógeno	176	440	5.2**	0.06*	(Argun and Kargi, 2010b)
<i>R. palustris</i> inmovilizada	Glucosa	Continuo	LED 590 nm	10		38.9***	56.0	(Tian et al., 2010)
<i>R. sphaeroides</i>	Lactato	Lote	Tungsteno	300*	4368	40.0**		(Akroum-Amrouche et al., 2011)
<i>R. capsulatus</i>	Glucosa	Lote	Halógeno	175	4790	58.0***	-	(Ghosh et al., 2012)
<i>R. palustris</i> inmovilizada	Glucosa	Continuo	LED 590 nm	100*	-	58.4***	82.3	(Wang et al., 2013)
<i>R. sphaeroides</i>	Malato	Lote	LED	100*	1330	11.1***	-	(Laocharoen and Reungsang, 2014)
<i>R. capsulatus</i>	Acetato	Lote	Tungsteno	264	-	23.3**	≈0.3	(Akman et al., 2015)
<i>Rhodobacter, Rhodospirillum, Rhodopseudomonas y Sulfurospirillum</i>	Acetato y butirato	Lote	Tungsteno	276*	1030	27.4**	-	(Lazaro et al., 2015)

* Estimada con los datos proporcionados en el artículo (tipo de iluminación e intensidad en otras unidades).

** Velocidad máxima de producción de H₂.

*** Velocidad promedio de producción de H₂.

oscuridad para funciones de mantenimiento, disminuyendo el sustrato disponible para la formación de H_2 (Uyar et al., 2007; Eroglu et al., 2010; Lazaro et al., 2015). Otros autores observaron que la cantidad de H_2 producida con iluminación continua y ciclos luz/oscuridad fue prácticamente igual (Eroglu et al., 2010; Montiel Corona et al., 2017). Existen reportes bibliográficos, en los que incluso se observó que la iluminación intermitente incrementó la productividad, la velocidad de producción y la eficiencia fotoquímica, al ahorrar energía con los ciclos de oscuridad (Koku et al., 2003; Montiel Corona et al., 2017). La mejora en la producción se ha atribuido a un aumento en la cantidad de biomasa alcanzada con iluminación intermitente, la mejora en la actividad y estabilidad de la enzima y el hecho de que la producción de H_2 es proporcional a la luz absorbida, por lo que los ciclos de oscuridad pueden retrasar la producción, pero manteniendo la productividad (Meyer et al., 1978; Koku et al., 2003; Montiel Corona et al., 2017).

Los resultados están influenciados por las cepas microbianas utilizadas y la duración de los ciclos luz/oscuridad. Debido a que las bacterias PNS pueden contener distintos tipos de nitrogenasa, los efectos de los ciclos luz/oscuridad pueden tener efectos diferentes sobre las enzimas y rutas metabólicas alternas de cada especie, incrementando o disminuyendo la producción de H_2 (Montiel Corona et al., 2017). El uso de ciclos luz/oscuridad de duración corta (30/30 y 60/60 min), suele ser ventajoso para la producción de H_2 (Wakayama et al., 2000; Montiel Corona et al., 2017). El uso de mezclado en los reactores proporciona ciclos luz/oscuridad en el orden de micro o milisegundos, a los que también se les atribuye una mejora en la producción y eficiencia fotoquímica, además de una mayor tolerancia a intensidades elevadas (Wakayama et al., 2000; Li et al., 2009; Krujatz et al., 2015).

El suministro de pequeñas cantidades de oxígeno durante los periodos de oscuridad (ambiente microaerobio) puede incrementar la producción de H_2 . Las células pueden formar ATP durante los periodos de oscuridad por respiración y

utilizarlo para la producción de H₂ cuando la iluminación reinicia (Matsuyama et al., 2000).

1.5.6.1 Iluminación solar

Una de las principales ventajas de la producción de H₂ por bacterias fotosintéticas, es la posibilidad de usar luz solar. Sin embargo, existen inconvenientes para el uso de esta energía, como lo son su naturaleza difusa y baja densidad energética. Esto conduce a bajas eficiencias que para ser mejoradas requieren incrementar la superficie de los reactores y por lo tanto los costos. Debido a que la intensidad de la luz incidente no es uniforme, el cultivo puede encontrarse en ambos extremos, sometido a altas intensidades que originen fotoinhibición y periodos de ausencia de luz que detengan la producción y puedan modificar el metabolismo bacteriano (Koku et al., 2002).

Intensidades de 1 kW/m², consideradas como cercanas a las máximas encontradas bajo iluminación solar, decrecieron significativamente la velocidad de producción de H₂ (Wakayama et al., 2000). Una configuración vertical de los reactores puede evitar una exposición prolongada a intensidades elevadas (Miyake et al., 1999) o el uso de mallas para reducir la intensidad luminosa que llega al reactor (Adessi et al., 2012) pueden disminuir los efectos de la fotoinhibición. Los experimentos de Uyar et al., (2007), en los que bloquean ciertas longitudes de onda para evaluar el efecto en la producción de H₂, indican que la luz solar durante la salida y puesta de sol, es más efectiva en la producción de H₂.

Al comparar con estudios con iluminación artificial, generalmente se obtienen producciones más bajas, debido a los factores ambientales, altas intensidades luminosas, periodos de oscuridad y fluctuaciones de temperatura que afectan la actividad enzimática (Montiel-Corona et al., 2015). La temperatura de los cultivos puede aumentar a niveles por encima de los tolerados por las bacterias PNS, sobre

todo a altas intensidades luminosas por la saturación del sistema fotosintético y la disipación del exceso de fotones como calor, requiriendo de sistemas de control eficientes (Avcioglu et al., 2011; Androga et al., 2016). Por otro lado, durante los periodos de oscuridad la temperatura puede decaer, afectando las velocidades de producción cuando la iluminación se restablece (Kim et al., 1982). Para evitar la disminución en la temperatura, sobre todo en invierno, los reactores pueden colocarse en invernaderos (Boran et al., 2010), aunque esto no evita el problema por completo.

Se ha observado que la producción diaria de H_2 se relaciona directamente con la radiación global diaria, que representa la cantidad total de energía que recibe el reactor en un día ($Wh/m^2día$) (Avcioglu et al., 2011; Boran et al., 2012). Incrementos en la radiación global diaria suelen incrementar la producción de H_2 .

A pesar de las limitaciones en el uso de energía solar, ésta sigue ofreciendo ventajas al hacer el proceso ambientalmente aceptable, sobre todo si la producción se realiza con sustratos de desecho (Miyake et al., 1999). Se ha observado que usando efluentes de fermentación oscura es posible alcanzar altas remociones de DQO ofreciendo alternativas al tratamiento de efluentes (Montiel-Corona et al., 2015). Se han realizado estudios con reactores tubulares de 80 y 90 L (Boran et al., 2010, 2012), este último con un efluente de fermentación oscura, las velocidades reportadas fueron 6.9 y 3.4 mL/Lh_{luz} . Sin embargo, las eficiencias de conversión de sustrato fueron sólo del 15 y 10%, respectivamente. Estas producciones se vieron afectadas por el cambio del pH y temperatura en el cultivo. Kim et al. (1982), reportan velocidades máximas de 124.5 mL/Lh y conversiones del 78% en un reactor de panel plano (con inclinación de 30°) de 33 L, usando lactato como sustrato. Las máximas velocidades fueron alcanzadas entre las 11:00 y 12:00 h.

1.6 Inmovilización de células

La inmovilización se refiere al confinamiento de las células en una región definida del espacio con retención de su actividad catalítica. Las ventajas de la inmovilización incluyen la recuperación y reúso del catalizador, fácil operación del reactor, separación del producto y estabilidad del proceso (Brena and Batista-Viera, 2006; Mateo et al., 2007). Otras ventajas son la posibilidad de operar en fase de crecimiento exponencial por un largo periodo, menor espacio y volumen de los reactores, mayor resistencia a toxinas e inhibidores enzimáticos y la operación con altas concentraciones celulares (Zagrodnik et al., 2013; Basak et al., 2014).

En fotofermentación se han utilizado principalmente dos técnicas de inmovilización, atrapamiento en materiales poliméricos (geles) (Planchard et al., 1989) y adhesión en superficie (formación de biopelículas) (Xie et al., 2012b). En la técnica por atrapamiento, las células se adicionan a una solución monomérica y la polimerización es inducida térmica o químicamente (Klibanov, 1983). La selección de la matriz requiere que ésta no sea tóxica, con alta capacidad de retención, resistencia mecánica, porosidad y que pueda ser preparada en tamaños y formas específicas. Debido a que el proceso requiere luz, también debe ser transparente (Rao and Hall, 1984; Basak et al., 2014). Esta técnica ha sido usada ampliamente demostrando distintas ventajas, entre éstas, el aumentar la tolerancia al amonio (Zhu et al., 1999b). Sin embargo, algunas de sus desventajas son que las células pueden disminuir su actividad durante el proceso de inmovilización, la baja resistencia mecánica, limitación al paso de luz y la poca estabilidad al operar por tiempos prolongados (Rao and Hall, 1984; Keskin et al., 2011). La Tabla 1.6 muestra algunos estudios con biomasa inmovilizada por atrapamiento.

En el caso de la inmovilización en superficie, el proceso ocurre naturalmente, como una estrategia de los microorganismos para sobrevivir a situaciones de estrés en el sistema. El proceso depende de las propiedades de la superficie como

Tabla 1.6. Estudios de producción de H₂ con células inmovilizadas por atrapamiento en geles

Microorganismo	Matriz	Sustrato	Operación	mL H ₂ /Lh	Y _{H₂} (%)	Observaciones	Referencia
<i>R. capsulata</i>	Carragenina	Lactato	Lote	65	60	Producciones similares a las logradas con biomasa suspendida. Posible limitación de luz.	(Francou and Vignais, 1984)
<i>R. rubrum</i>	Agar	Lactato	Continuo	57	19	Operación por más de 3000 h con pérdida del 60% de actividad. Velocidades hasta 2 veces más altas que en cultivo suspendido.	(von Felten et al., 1985)
<i>R. palustris</i>	Agar y membrana microporosa	Malato	Lote	8	-	Limitaciones difusionales.	(Planchard et al., 1989)
<i>R. sphaeroides</i>	Quitano	Lactato	Lote	90	-	Disminución del efecto inhibidor del amonio.	(Zhu et al., 1999b)
<i>R. sphaeroides</i>	Agar	Agua residual de tofu (azúcares)	Lote	16	-	Protección contra inhibición por amonio.	(Zhu et al., 1999a)
<i>R. palustris</i>	Alcohol polivinílico-ácido bórico	Glucosa	Continuo	-	2	Buena penetración de la luz. Operación estable por 20 días.	(Tian et al., 2009)
<i>R. palustris</i>	Alginato	Malato	Lote	4	-	Producciones similares a cultivo suspendido.	(Merugu et al., 2012)
<i>R. capsulatus</i>	Agar	Acetato	Lote secuencial	17	70	Incremento de la productividad al doble con respecto a cultivo suspendido. Estabilidad del pH. Operación por 60 días.	(Elkahlout et al., 2017)

Tabla 1.7. Estudios de producción de H₂ por células inmovilizadas en biopelículas

Microorganismo	Soporte	Sustrato	Operación	mL H ₂ /Lh	SC (%)	Observaciones	Referencia
<i>R. sphaeroides</i>	Placa de vidrio poroso	Succinato	Continua	263	75	Producción estable por 40 días. Mejora en la iluminación por reflexión de la luz en el vidrio.	(Tsygankov et al., 1994)
<i>R. sphaeroides</i>	Espuma de poliuretano	Lactato	Continua	96	86	Proceso de formación de la biopelícula lento.	(Fedorov et al., 1998)
<i>R. palustris</i>	Arcilla	Acetato	Continuo	44	89	Iluminación interna y externa. Incremento en la velocidad más del 60%.	(Chen and Chang, 2006)
<i>R. palustris</i>	Arcilla	Efluente de FO (Acetato/butirato)	Lote	32	43	Iluminación interna y externa.	(Chen et al., 2008b)
<i>R. palustris</i>	Cubierta de látex	Acetato	Lote secuencial	2.9	-	Operación por 4000 h sin crecimiento celular.	(Gosse et al., 2010)
<i>R. palustris</i>	Fibra óptica rugosa	Glucosa	Continuo	39	11	Iluminación interna mejora en la eficiencia fotoquímica	(Guo et al., 2011)
<i>R. sphaeroides</i>	Fibra de vidrio	Efluente de FO (lactato/acetato/butirato)	Continuo	128	60	Tolerancia a altas concentraciones de VFA y amonio. Operación estable por 3 meses	(Tekucheva et al., 2011)
<i>R. faecalis</i>	Fibras de carbón activado	Acetato	Lote	33	77	Resistencia a agitación y buena distribución de la luz. Incremento del 20% en la velocidad.	(Xie et al., 2012a)
<i>R. sphaeroides</i>	Vidrio poroso	Malato	Semicontinuo	59	70	Producción decrece tras 3 meses de operación.	(Zagrodnik et al., 2013)
<i>R. sphaeroides</i>	Vidrio poroso	Malato	Continuo	13	-	Operación en continuo con altas concentraciones de biomasa.	(Zagrodnik et al., 2015)

FO. Fermentación oscura.

rugosidad, porosidad, hidrofobicidad y carga (Tsygankov and Kosourov, 2014). Este método de inmovilización disminuye las limitaciones difusionales (transferencia de masa de sustratos y productos) debido a un contacto directo entre las células y el medio. Esto también puede evitar inhibición por producto (Keskin et al., 2011; Xie et al., 2012b). Sin embargo, el uso de soportes muy densos puede provocar que estos sedimenten y puede haber zonas del soporte que no reciban una adecuada iluminación provocando el consumo del sustrato sin producción de H₂ (Xie et al., 2012b). En la Tabla 1.7 se observan diversos estudios usando inmovilización por biopelícula para la producción de H₂ por fotofermentación. El vidrio ha sido usado como soporte para la inmovilización de bacterias PNS, debido a que es un material transparente. Sin embargo, ya que este posee una carga negativa (misma carga de los microorganismos), se requiere modificar la superficie químicamente para favorecer la inmovilización (Zagrodnik et al., 2013; Tsygankov and Kosourov, 2014). La formación de agregados celulares también ha sido explorada en la fotofermentación para incrementar la producción de H₂ (Xie et al., 2013, 2015).

Los estudios indican que las velocidades más altas de producción de H₂ se han conseguido en sistemas con biomasa inmovilizada (Tsygankov et al., 1994; Zhu et al., 1999b; Tekucheveva et al., 2011), mostrando además una ventaja en los procesos en continuo, debido a que se puede retener una alta concentración de biomasa en el interior del sistema (Zagrodnik et al., 2015).

1.7 Sistemas en continuo para la producción de hidrógeno por fotofermentación

La mayor parte de los estudios realizados en fotofermentación han sido en cultivos en lote. Sin embargo, los procesos en continuo pueden incrementar la producción de H₂ y la eficiencia de conversión del sustrato, ya que la adición continua de sustrato permite una alta concentración de la fuente de carbono en el sistema, lo que lleva a que el cultivo se desarrolle en fase exponencial (Zhang et al., 2015).

Sin embargo, la efectividad del proceso en continuo depende del tiempo de retención hidráulica (TRH). En un proceso en continuo el sustrato alimentado es utilizado en la producción de H_2 , para crecimiento y mantenimiento celular y parte del sustrato que no es utilizado es liberado con el efluente (Xie et al., 2014). Las bacterias PNS se caracterizan por bajas velocidades de consumo de sustrato, por lo que TRH cortos pueden ser insuficientes para el aprovechamiento del sustrato y para adaptar las células al medio ambiente. Además, debido a que también poseen bajas velocidades de crecimiento y baja capacidad para sedimentar, las células pueden ser lavadas del reactor (Xie et al., 2015; Zhang et al., 2015). Como resultado del lavado, los microorganismos utilizarán una mayor cantidad de sustrato para mantener el estado estacionario y se lograrán concentraciones más bajas de biomasa en el reactor, disminuyendo el consumo de sustrato y la producción de H_2 (Xie et al., 2014).

Por lo anterior, los procesos suelen trabajar con TRH largos (cargas orgánicas bajas) para lograr altas velocidades y conversiones de sustrato. No obstante, TRH muy largos pueden provocar que el sustrato se agote rápidamente y afectar el cultivo al llevarlo a la fase de crecimiento estacionaria (Zhang et al., 2015). Los TRH largos también pueden favorecer otras rutas metabólicas, como la acumulación de PHB (Koku et al., 2003). La Tabla 1.8 muestra los TRH utilizados en los procesos fotofermentativos y las productividades alcanzadas. Los TRH van de 2.5 a 244 h. Aunque con el TRH de 2.5 h se reportó una alta velocidad (Tawfik et al., 2014), el reactor operó con carga orgánica baja (baja concentración de sustrato en el influente).

Algunos autores han preferido el uso de sistemas semicontinuos y lote alimentado para la fotofermentación, debido a que se retiene una mayor cantidad de biomasa y sustrato en el sistema. Sin embargo, estos sistemas pueden presentar problemas en la operación a largo plazo (Ren et al., 2009b; Wu et al., 2016b). Otros estudios se han enfocado en la formación de agregados celulares (Xie et al., 2013,

Tabla 1.8. Tiempos de retención hidráulica (TRH) reportados en fotofermentación y productividad de H₂

Microorganismo	Sustrato	DQO _{in} (g/L)	TRH (h)	R _{H₂} (mL/Lh)	Y _{H₂} (%)	ΔDQO (%)	Referencia
<i>R. capsulatus</i>	Lactato	3.1	17	80	30	75	(Tsygankov et al., 1998)
<i>R. capsulata</i>	Acetato/ propionato	3.8*	72	21	46	-	(Shi and Yu, 2006)
<i>R. palustris</i> (inmovilizada)	Acetato	1.0	36	44	90	-	(Chen and Chang, 2006)
Cultivo mixto (<i>Rhodobacter sp.</i>)	Acetato/ butirato	6.3	48	8	-	-	(Li et al., 2008)
<i>R. capsulatus</i>	Acetato	3.1	240	15	69	-	(Androga et al., 2011a)
<i>R. palustris</i>	Efluente de FO (Acetato/lactato/ butirato)	1.4*	96	7	23	-	(Lo et al., 2011)
<i>R. sphaeroides</i>	Glucosa	11.6*	48	52	75	-	(Abo-Hashesh et al., 2013)
Cultivo mixto (<i>R. palustris</i> , 80%)	Efluente de FO (Acetato/lactato/ butirato/propionato)	0.6	2.5	121	-	86	(Tawfik et al., 2014)
<i>R. faecalis</i>	Acetato	2.4	60	19	47.3	75	(Xie et al., 2014)
<i>R. faecalis</i> (bioagregados)	Acetato	3.9	96	44	83.8	96	(Xie et al., 2015)
Cultivo mixto	Efluente de FO (azúcares)	11.2*	24	156	-	-	(Zhang et al., 2015)
<i>R. sphaeroides</i>	Malato	1.7*	22	13	-	-	(Zagrodnik et al., 2015)
<i>R. sphaeroides</i>	Lactato	5.2*	10	165	37	-	(Krujatz et al., 2015)
<i>R. palustris</i> (inmovilizada)	Glucosa	10.5	48	35	11.7 ^a	-	(Liu et al., 2016)

* Estimado
FO. Fermentación oscura

2015) o el uso de sistemas con biomasa inmovilizada para evitar el lavado celular (Tekucheve et al., 2011), logrando buenos resultados.

1.8 Uso de efluentes de fermentación oscura

La fermentación anaerobia de carbohidratos produce distintos intermediarios, como ácidos orgánicos de baja masa molar, los cuales pueden convertirse a H_2 por bacterias fotosintéticas en un segundo proceso (Das and Veziroğlu, 2001).

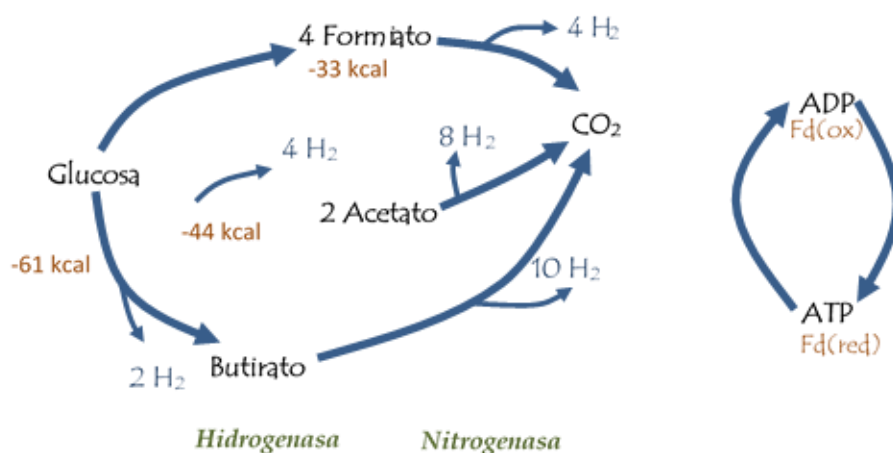
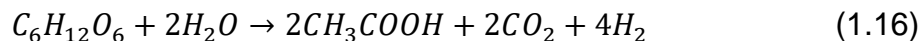


Figura 1.2. Bioquímica de la descomposición de la glucosa por bacterias fermentativas y fotosintéticas en sistemas híbridos de producción biológica de H_2 . Tomado de (Das and Veziroğlu, 2001)

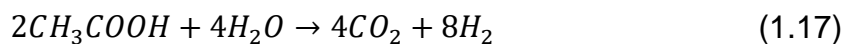
La Figura 1.2 muestra en forma breve, la energética de la producción de H_2 en un proceso combinado de fermentación oscura y fotofermentación. Las bacterias anaerobias obtienen energía y electrones a partir de carbohidratos (su principal fuente de C). El proceso de fermentación oscura se da con una energía libre de Gibbs negativa, por lo que los ácidos grasos que se producen no pueden ser llevados a H_2 por acción de los mismos microorganismos. Sin embargo, la degradación completa a H_2 y CO_2 es posible si se utilizan bacterias fotosintéticas, que pueden captar energía de la luz y llevar el proceso con energía libre de Gibbs

positiva. Partiendo de glucosa y suponiendo ácido acético como subproducto principal de la fermentación oscura, las reacciones son (Das and Veziroglu, 2008):

Etapa I: Fermentación oscura (Anaerobios facultativos):



Etapa II: Fotofermentación (Bacterias fotosintéticas):



Lo anterior muestra que sería posible producir hasta 12 moles de H_2 por mol de glucosa en un proceso combinado de fermentación oscura y lumínica. Esto también brinda la posibilidad de realizar la producción de H_2 aprovechando efluentes industriales (Keskin et al., 2011).

La Figura 1.3 muestra la forma en que puede acoplarse la fotofermentación con la fermentación oscura. El proceso en una etapa se refiere a la producción de H_2 por fotofermentación, ya sea partiendo de carbohidratos, generalmente con baja eficiencia (Subudhi et al., 2016) o de los ácidos grasos producidos por fermentación oscura. En los procesos en co-cultivo, ambas reacciones ocurren en un mismo reactor manteniendo especies microbianas encargadas de ambos procesos en un mismo ambiente (Takagi et al., 2016). En la producción en dos etapas la fermentación oscura se realiza en un reactor independiente y el efluente de éste es enviado a un fotofermentador para continuar el proceso de forma secuencial (Morsy, 2017).

Aunque los co-cultivos representan procesos en apariencia sencillos, la eficiencia puede ser baja debido a que las especies microbianas encargadas de los dos procesos difieren en sus requerimientos de cultivo. Al favorecer las condiciones

de cultivo de una especie, el metabolismo de la otra puede afectarse. Además, las bacterias PNS (debido a la capacidad para consumir diversos sustratos) pueden ajustar su metabolismo para el consumo de carbohidratos, afectando el consumo de ácidos grasos (Argun and Kargi, 2010a).

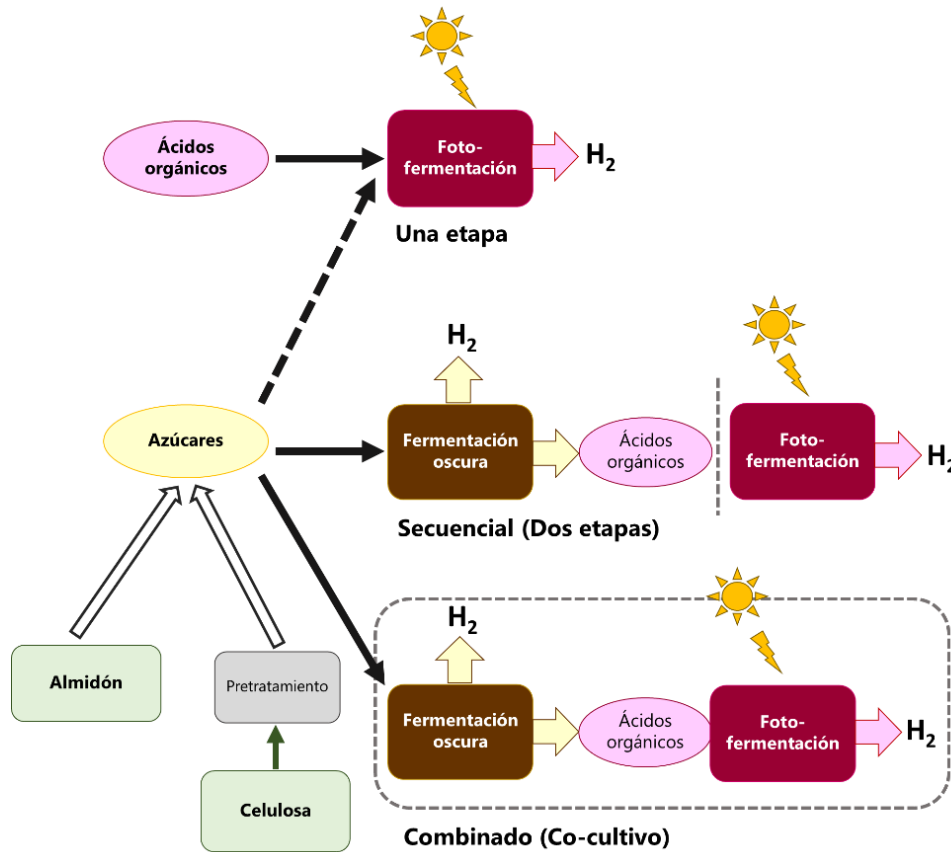


Figura 1.3. Estrategias para la producción de H₂ usando fermentación oscura y fotofermentación. Tomado de Keskin et al., 2011

En el proceso en dos etapas, las condiciones de cultivo pueden manipularse para soportar el crecimiento de especies microbianas diferentes. Es decir, las condiciones de cultivo pueden ser optimizadas en el primer estado para la fermentación anaerobia en oscuridad y en el segundo estado para la fotofermentación. El inconveniente es que puede haber acumulación de componentes (ácidos orgánicos) que pueden inhibir el proceso y que en co-cultivo podrían ser consumidos por bacterias PNS de forma inmediata (Sakurai et al.,

Tabla 1.9. Producción de H₂ por fotofermentación a partir de efluentes de fermentación oscura

Microorganismo	Efluente	Fuente de Carbono	Operación	R _{H2} (mL H ₂ /Lh)	Y _{H2} (%)	ΔDQO (%)	Referencia
<i>R. capsulata</i>	Glucosa	Acetato/butirato/propionato	Continuo	12*	40	-	(Shi and Yu, 2006)
<i>R. sphaeroides</i>	Sacarosa	Acetato/butirato	Lote	-	16	-	(Tao et al., 2007)
<i>R. palustris</i>	Glucosa	Acetato/butirato	Lote	-	32	-	(Su et al., 2009)
<i>R. sphaeroides</i>	Almidón de trigo	Acetato/butirato/propionato	Continuo	1	11	-	(Ozmihci and Kargi, 2010)
<i>R. capsulatus</i>	Melaza de remolacha	Acetato/lactato	Lote alimentado (luz solar)	11	50	10	(Avcioglu et al., 2011)
<i>Rhodopseudomonas</i> inmovilizada	Suero de queso	Acetato/butirato	Lote	12	41	9	(Rai et al., 2011)
<i>R. capsulatus</i>	Jugo de remolacha azucarera	Acetato	Lote alimentado (Luz solar)	25	77	-	(Özkan et al., 2012)
<i>R. sphaeroides</i> inmovilizada	Almidón	Lactato/acetato/butirato	Continuo	128	60	-	(Tekucheva et al., 2011)
<i>R. sphaeroides</i>	Almidón de papa	Acetato/butirato	Lote alimentado	22	3	-	(Laurinavichene et al., 2012)
<i>R. capsulatus</i>	Hidrolizados de paja de cebada	Acetato/lactato	Lote	9	33	-	(Özgür and Peksel, 2013)
<i>R. palustris</i>	Agua residual obtención de almidón	Acetato/butirato	Continuo	42*	26	27	(Nasr et al., 2015)
<i>R. palustris</i>	Vegetales y frutas	Acetato/butirato/propionato	Lote	-	43	80	(Montiel Corona et al., 2017)

* Estimado

2013). La Tabla 1.9 muestra algunos estudios de producción de H₂ por fotofermentación usando efluentes de fermentación oscura. Estos estudios generalmente requieren la filtración del efluente y la dilución para ajustar la concentración de ácidos grasos a niveles que no sean tóxicos.

A pesar de los estudios que se han realizado en la producción de H₂ por fotofermentación, el proceso sigue teniendo inconvenientes que no han permitido el escalamiento. Muchos trabajos se han realizado para determinar los factores de mayor influencia en el proceso, sin embargo, estos generalmente se dirigen a la evaluación de variable por variable, lo que demanda mucho tiempo y omite el efecto combinado de dos o más factores (Ghosh et al., 2012). Por otro lado, aunque se han realizado estudios con reactores en escala piloto usando iluminación solar y efluentes de fermentación oscura, el principal inconveniente sigue siendo el uso de cepas puras (Boran et al., 2010; Adessi et al., 2012). Los estudios a volúmenes piloto han requerido esterilización, lo que no resulta viable para aplicaciones a gran escala. Por otro lado, en condiciones de iluminación solar, las eficiencias de conversión de sustrato y velocidades de producción de H₂ son generalmente bajas.

Por lo anterior, en este estudio se evaluó el uso de un consorcio microbiano inmovilizado para la producción de H₂ por fotofermentación, buscando incrementar la producción y establecer un proceso más robusto que permita una aplicación práctica, determinando el efecto de distintas variables del proceso. El uso de consorcios microbianos permite la operación del sistema sin necesidad de mantener condiciones estériles, mientras que al usar biomasa inmovilizada se buscó evitar algunos de los inconvenientes presentados en los procesos fotofermentativos, como factores inhibitorios, limitación de la iluminación y disminución en la concentración celular en los procesos en continuo.

Capítulo 2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

1. El uso de biomasa inmovilizada permitirá incrementar la producción de hidrógeno al evitar problemas de inhibición e incrementar la concentración celular en el sistema sin lavado celular durante la operación en continuo.
2. La optimización de condiciones de proceso como pH inicial, tipo de iluminación e intensidad luminosa incrementarán la producción de hidrógeno al influir en la actividad enzimática y síntesis de pigmentos.
3. El control del TRH, tanto en condiciones de luz artificial como solar, incrementará la producción de hidrógeno al influir en la comunidad microbiana y en las velocidades de producción de hidrógeno y en el consumo de sustrato.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de las variables de proceso en la fotofermentación con un consorcio microbiano inmovilizado de bacterias púrpuras fototróficas, incrementando la producción de hidrógeno en continuo a partir de ácidos grasos presentes en efluentes de fermentación oscura.

2.2.2 Objetivos Particulares

1. Seleccionar el soporte adecuado para la inmovilización del consorcio microbiano y la operación en continuo en el reactor con base en su capacidad de retención

de una mayor cantidad de biomasa por unidad de volumen, favoreciendo la producción de hidrógeno.

2. Identificar las especies microbianas presentes en el consorcio microbiano seleccionado por medio de técnicas moleculares.
3. Evaluar el impacto del pH, tipo de iluminación e intensidad luminosa sobre la producción de H_2 con el consorcio microbiano a través de técnicas estadísticas que permitan ver la interacción entre variables, optimizando la producción de hidrógeno y el consumo de sustrato.
4. Evaluar el efecto del tiempo de retención hidráulica (TRH) sobre la producción en continuo de hidrógeno en un fotobiorreactor operando con biomasa fija con ácidos grasos presentes en efluentes de fermentación oscura, considerando la estabilidad del proceso y la remoción de materia orgánica.
5. Evaluar el efecto del TRH en la comunidad microbiana durante la operación en continuo del reactor, usando técnicas moleculares.
6. Evaluar el uso de energía solar como fuente alternativa en la producción de hidrógeno usando un efluente de fermentación oscura en la producción continua de hidrógeno.
7. Evaluar el efecto de la concentración de molibdeno, hierro y vanadio sobre la producción de hidrógeno y actividad enzimática por medio de técnicas estadísticas.

Capítulo 3. Materiales y Métodos

3.1 Estrategia Experimental

La Figura 3.1 presenta el esquema general con el que se desarrolló este trabajo. Del capítulo 1 al 3 se presenta la revisión del estado del arte, el planteamiento del problema, hipótesis, objetivos del trabajo y metodología general.

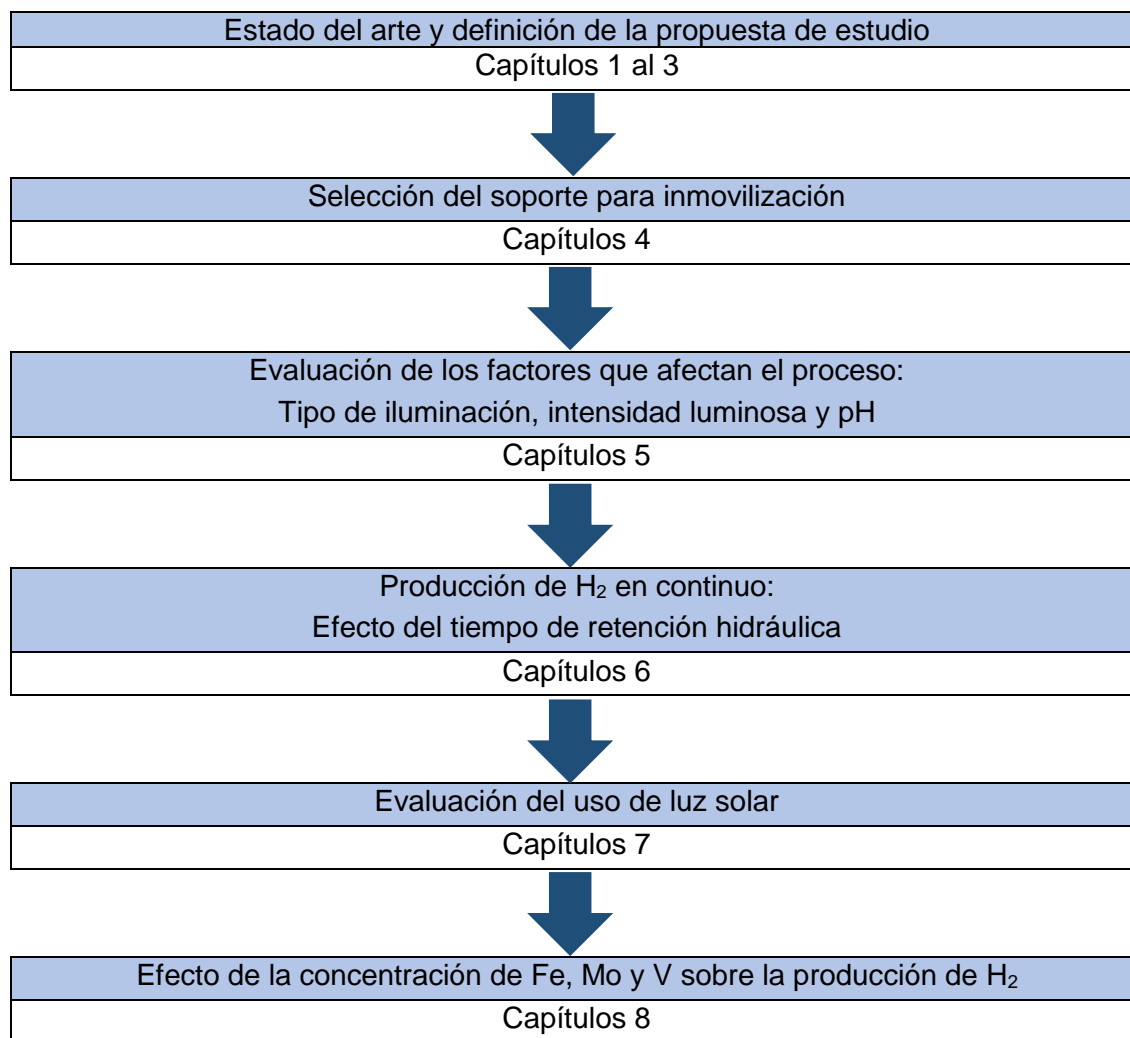


Figura 3.1. Diagrama general de la Estrategia Experimental seguida durante el desarrollo de la tesis

El trabajo experimental se divide en cinco capítulos. El Capítulo 4 aborda la selección del material de soporte para la inmovilización del consorcio microbiano. Los experimentos fueron realizados en botellas serológicas usando acetato y butirato como sustrato. Se evaluaron como soportes barras de acrílico, cilindros de polietileno y fibras de luffa (estropajo natural). Se seleccionó el soporte que permitiera la mayor cantidad de biomasa inmovilizada por unidad de volumen de material sin afectar la iluminación del reactor y la producción de H₂. Durante esta etapa también se realizó la caracterización del consorcio microbiano por medio de técnicas de biología molecular.

En el Capítulo 5 se muestra la evaluación del efecto de la iluminación en la fotofermentación con el consorcio microbiano inmovilizado comparando tres tipos de lámparas: tungsteno, fluorescente y LED amarillo, que presentan distintos espectros de emisión. Usando la lámpara seleccionada, a través de un diseño central compuesto con superficie de respuesta, se optimizan el efecto de la intensidad luminosa y el pH en la producción de H₂ y remoción de materia orgánica. Los experimentos se realizaron en lote, en botellas serológicas usando un medio de acetato, butirato y propionato (Cardeña et al., 2015).

El Capítulo 6 presenta el efecto del TRH sobre la producción de H₂ en la operación en continuo de un reactor tubular de 260 mL con ciclos luz/oscuridad 12h/12h. Se utilizó un medio sintético de acetato, butirato y propionato, con dos concentraciones diferentes del influente. Los TRH evaluados variaron entre 24 y 96 h. Durante la operación se tomaron muestras de la biomasa para analizar el cambio en la comunidad microbiana.

El Capítulo 7 describe la evaluación de la producción de H₂ con iluminación solar y un efluente de fermentación oscura conteniendo principalmente glucosa, acetato, butirato y propionato. Los experimentos se realizaron en un reactor tubular

de vidrio con 400 mL de medio y a dos TRH, 48 y 60 h. Se evaluó el efecto de las condiciones ambientales sobre la producción de H₂ y el consumo de sustrato.

En el Capítulo 8 se presenta la evaluación del efecto de la concentración de tres metales: molibdeno, hierro y vanadio que son cofactores de las nitrogenasas presentes en las bacterias fotofermentativas. Los experimentos se realizaron en botellas serológicas, en lote. Se usó un diseño central compuesto con metodología de superficie de respuesta para encontrar las concentraciones óptimas de los metales que permitieran incrementar la producción de H₂.

A continuación, se presentan metodologías, materiales y técnicas usadas en el desarrollo de este trabajo.

3.2 Inóculo

Para la selección del inóculo se utilizó un consorcio microbiano, tomando como referencia los resultados de un trabajo previo del grupo (Cardeña, 2013), en los cuales se evaluaron tres diferentes consorcios. De acuerdo con los resultados de dicho trabajo, el inóculo con el que se obtuvo una mejor producción de H₂ fue el proveniente del ánodo de un sistema bioelectroquímico (SBE) (Ruiz et al., 2014) usado para producir H₂, por lo que éste fue utilizado durante los experimentos. Para la preparación del inóculo se utilizó medio de crecimiento descrito en la Sección 3.3.1, temperatura de 32°C, pH de 6.8 e intensidad luminosa de 5 klux. Se usó vacío (argón cuando se indique) para desplazar el oxígeno del medio. Para cosechar la biomasa, el cultivo se centrifugó a 3000 rpm por 15 min (Centrífuga Solbat, C40, México).

3.3 Medios de cultivo

3.3.1 Medio de Crecimiento

Se utilizó el medio basal reportado por Li et al., (2008), el cual consta de (mg/L): K_2HPO_4 750, $MgSO_4$ 200, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 11.78, H_3BO_3 2.80, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.75, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.24, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 2.10, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.04, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.75, EDTA-Na 2.00, Vitamina B1 3.78 y Biotina 3.57.

Como fuente de carbono se utilizó acetato y butirato de sodio en concentraciones de 1.48 y 3.30 g/L, respectivamente, y como fuente de nitrógeno glutamato de sodio en concentración de 0.37 g/L (DQO \approx 6000 mg/L), con una relación C/N de 70. El pH se ajustó a 6.8.

3.3.2 Medio de producción de hidrógeno

Se usó el medio basal de crecimiento y como fuente de carbono: acetato, propionato y butirato, que son los principales ácidos grasos formados de la fermentación oscura de aguas residuales (Shi and Yu, 2005), en las concentraciones determinadas como óptimas por Cardeña et al., (2015): 1200 mg/L de ácido acético, 1571 mg/L de ácido butírico y 715 mg/L de ácido propiónico. Como fuente de nitrógeno se usó glutamato de sodio (1740 mg/L), manteniendo una relación C/N de 16 (Lazaro et al., 2012).

3.4 Determinación del crecimiento microbiano

3.4.1 Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)

La determinación de Sólidos Suspendidos Volátiles se realizó de acuerdo con métodos estándar (APHA, 1999). Se usó el método 2540E. Para el tratamiento de la muestra, se tomó un volumen bien mezclado y se filtró al vacío con los filtros

Whatman ® GF/A (1.6 µm). Se lavó 3 veces con un volumen de 10 mL de agua destilada. Una vez eliminada el agua, los filtros se colocaron en charolas de aluminio y se secaron en estufa a una temperatura de 103-105°C por una hora. Se colocaron en desecador para su enfriamiento y posteriormente se pesaron en balanza analítica. El procedimiento secado-enfriado-pesado se repitió hasta tener una diferencia en peso menor a 4%. Se registró el peso constante (A). Posteriormente se trasladó a una mufla a 550°C por 15 min para su incineración. Se colocaron nuevamente en la estufa a 103-105°C por 15 min y posteriormente en desecador otros 15 min para poder pesarlos en balanza analítica. El proceso de incineración-enfriamiento-desecación-pesado se repitió hasta conseguir una variación en peso menor al 4%. Se registró el peso final (B). El cálculo de SSV se hizo de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$mg\ SSV / L = \frac{(A - B)}{mL\ de\ muestra\ tomada} 1000 \quad (3.1)$$

A = Peso de la muestra + filtro antes de la incineración

B = Peso de la muestra + filtro después de la incineración

3.4.2 Curva SSV vs Absorbancia

Se relacionó la concentración de SSV con la absorbancia para facilitar la determinación de biomasa (biomasa suspendida) a ocupar como inóculo. Se prepararon diluciones de la muestra de biomasa activada en el medio de crecimiento y se hicieron determinaciones de SSV y lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro Lambda 25 UV/VIS (Perkin Elmer) a una longitud de onda de 660 nm (DO₆₆₀) (Basak and Das, 2009; Lazaro et al., 2012). Se realizaron las curvas de calibración SSV vs DO₆₆₀ con los resultados a fin de facilitar la determinación de la concentración de inóculo usada en los experimentos.

3.4.3 Determinación de proteína celular

Para la determinación de la biomasa adherida a los soportes se usó la determinación de proteínas por el método de Lowry (1951) modificado. Para la cuantificación de proteínas en la biomasa fija, se tomaron muestras de los soportes, se colocaron en tubos con buffer de fosfatos (volumen necesario para cubrir los soportes) y sonicaron (Hernández, 2011) por 45 min en un baño sonicador (Branson 2510R-DTH). Con la muestra sonicada se determinó la concentración de proteínas. Para cada mililitro de muestra se agregó 1 mL de reactivo de formación de complejo (Solución conteniendo $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Tartrato de Sodio y Potasio y SDS) recién preparada, se agitó y dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min. Se adicionaron 0.5 mL de reactivo de Folin 0.2N por cada mililitro de muestra, se agitó con vórtex y dejó reposar por 40 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se leyó la absorbancia a 750 nm (DO_{750}) del sobrenadante (eliminación del soporte). Para determinar la concentración de SSV, se hicieron curvas de calibración correlacionando los SSV vs DO_{750} . Las muestras de soporte se secaron en estufa a 110°C hasta peso constante para determinar la concentración de biomasa por gramo de soporte utilizado (mg SV/g soporte seco).

3.5 Consumo de sustrato

El consumo de sustrato se evaluó a través de la concentración de AGV's y la DQO soluble:

3.5.1 Ácidos Grasos Volátiles (AGV's) y etanol

Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm por 20 min. El sobrenadante se pasó a través de filtros de nitrocelulosa de 0.45 μm (MF-Millipore). Las muestras se diluyeron y acidificaron con una solución de HCl 2N. El análisis se hizo con un cromatógrafo de gases (Agilen Tech 6890N, VARIAN 330C) equipado con un

detector de ionización de flama (FID por sus siglas en inglés) y una columna capilar de sílice Zebram ZV-FFPA de 0.53 (mm) de diámetro, 15 m de largo y 1 μm de espesor de película. La temperatura inicial del horno fue 60°C, la cual se incrementó a razón de 15°C/min hasta alcanzar una temperatura final 90°C. Posteriormente, la temperatura se incrementó a 170°C a razón de 25°C/min, la temperatura final se mantuvo por 4.5 min. La temperatura del inyector fue 190°C y la del detector, 210°C. El gas portador fue nitrógeno a un flujo de 2.5 mL/min.

3.5.2 Demanda Química de Oxígeno soluble (DQO_s)

Las muestras se centrifugaron y filtraron (MF-Millipore, 0.45 μm). Las determinaciones se hicieron de acuerdo con el método 8000 (HACH, 2002), usando tubos HACH con solución de dicromato de potasio y ácido sulfúrico. La digestión se llevó a cabo en un reactor HACH a 150°C y se leyeron en un espectrofotómetro HACH (DR/2800) a 620 nm.

3.6 Compuestos inhibitorios

3.6.1 Nitrógeno amoniacal (NH₃-N)

Se determinó por el método 10031 (HACH, 2002). Se usó un vial HACH como blanco y el otro con la muestra a evaluar. Al blanco se le agregó 0.1 mL de agua desionizada (libre de amonio) y al otro 0.1 mL de muestra. A cada vial se le agregó el contenido de una almohadilla con el reactivo de salicilato de amonio (polvo) para un volumen de 5 mL. Posteriormente se añadió el contenido de la almohadilla con el reactivo de cianurato de amonio (polvo), para un volumen de 5 mL. Los viales se cerraron y agitaron suavemente hasta disolución completa. Después de 20 min de reacción, se leyeron en el espectrofotómetro (HACH DR/2800) a 655 nm usando el blanco como cero. El resultado se expresa en mg/L de NH₃-N.

3.7 Biogás producido

El volumen de biogás producido se midió por desplazamiento de una columna de agua. El agua fue acidificada con HCl hasta un pH de 2 a fin de evitar la disolución del CO₂.

3.7.1 Composición del biogás

Se tomaron de 4 a 10 mL de muestra homogeneizada del biogás con una jeringa para su análisis. Se usó un cromatógrafo de gases (SRI 8610C) con detector de conductividad térmica (TCD) y columna de sílica gel de 1.82 m en serie con una columna de tamiz molecular 13x de 1.82m y un diámetro de 3.175 mm. La temperatura inicial de la columna fue de 40°C, la cual se mantuvo por 4 min. Posteriormente la temperatura se elevó hasta 110°C a razón de 20°C/min. La temperatura final se mantuvo por 1.5 min. Las temperaturas del inyector y detector fueron 90 y 150°C, respectivamente. El gas acarreador fue nitrógeno con un flujo de 20 mL/min.

3.8 Intensidad luminosa y pH

Para medir la intensidad luminosa de los cultivos se usó un medidor digital de luz Extech LT300. Para la medición de pH se utilizó un potenciómetro (OAKTON 510, probe Orion 9156BNWP).

3.9 Análisis molecular de la comunidad microbiana

3.9.1 Extracción de ADN

Para la identificación de las especies microbianas, el ADN fue extraído con un kit comercial (Ultra Clean Soil DNA, MoBio) siguiendo las especificaciones del

proveedor. La extracción se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa usando como referencia un marcador de peso molecular (250 bp DNA Ladder, Invitrogen). La electroforesis se realizó a 60V por 20 min en buffer TAE (40 mM Tris, 40 mM de ácido acético y 10 mM de EDTA 2Na.2H₂O). El gel fue revelado con SYBR Green (Invitrogen, USA) por 20 min y lavado con agua desionizada por 10 min. Se usó un transiluminador UV para observar el gel y un fotodocumentador (Gel Logic 200 Imaging System, Eastman Kodak Company, USA). La concentración de ADN extraído se cuantificó usando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermoscientific 2000c, USA).

3.9.2 Análisis de las especies microbianas

Para la identificación de las especies microbianas, incluyendo arqueas y bacterias, se siguió la metodología descrita por Váldez-Vázquez et al. (2017). El ADN extraído fue sometido para secuenciación al *Research and Testing Laboratory* (Texas, U.S.A.). Para la secuenciación de los amplicones se usaron dos plataformas distintas (según se especifique): 454-Genome Sequencer FLX Titanium (Roche, Suiza) y MiSeq (Illumina, Inc., U.S.A.). Se amplificaron los genes 16S rRNA utilizando los pares de cebadores (primers) 28F y 519R o 388R (según se especifique), para bacterias y 517F y 909R para arqueas. Las secuencias generadas fueron sometidas a una evaluación de calidad (Edgar, 2010; Edgar et al., 2011), seleccionando las que cumplían con los siguientes parámetros: promedio de calidad > 25 y longitud mínima de 250 bps. Las secuencias con homopolímeros de 6 bps y las que no tenían concordancia con los cebadores utilizados no se consideraron para el análisis. Las secuencias que cumplieron con los requerimientos se agruparon en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs, por sus siglas en inglés) basadas en 97% de identidad, usando el algoritmo UPARSE (Edgar, 2013). La secuencia de mayor abundancia fue escogida como la representativa de cada grupo. Estas secuencias fueron clasificadas

taxonómicamente usando el algoritmo de alineación USEARCH (Edgar, 2010) y se compararon con la base de datos del NCBI.

Capítulo 4. Evaluación de materiales de soporte para la inmovilización de un consorcio fotofermentativo productor de hidrógeno

Resumen

Se evaluaron tres diferentes materiales como soporte para la inmovilización de un consorcio de bacterias PNS en la producción de H₂. El inóculo se aisló de un sistema bioelectroquímico. El análisis molecular del mismo mostró como especie mayoritaria a *Rhodopseudomonas palustris*. Los soportes evaluados fueron barras de acrílico, cilindros de polietileno de alta densidad (PEAD) y luffa (como fibras dispersas y en cubos). Se evaluó la producción de H₂ a partir de ácidos grasos volátiles en botellas serológicas con iluminación continua (7 klux) a 32 °C. La producción de H₂ observada fue de 14 a 20 mL H₂/g SV/h para los soportes evaluados. La luffa como fibras dispersas, mostró la más alta concentración de biomasa inmovilizada (19.6 ± 1.5 mg SV/cm³ de soporte), seguido de la luffa en cubos, cilindros de PEAD y barras de acrílico. Las fibras de luffa dispersas favorecieron una mejor distribución de la luz y un mejor contacto con el medio en comparación con la luffa en cubos. No se observó diferencia significativa en la producción de H₂ de los tres soportes cuando se usó la misma cantidad de biomasa. Las fibras de luffa fueron el soporte más adecuado debido a su relación área/volumen, lo que permite una mayor cantidad de biomasa inmovilizada y una mejor distribución de la luz.

Artículos derivados de este capítulo:

Guevara-López, E., Buitrón, G., 2015. Evaluation of different support materials used with a photo-fermentative consortium for hydrogen production. Int. J. Hydrog. Energy 40, 17231–17238.

4.1 Introducción

Las bacterias púrpuras fotosintéticas (PNS) han sido consideradas el sistema biológico más prometedor para la producción de H_2 por fotofermentación, debido a su alta conversión de sustrato, su fotosíntesis sin generación de oxígeno, su habilidad para utilizar luz de un amplio intervalo de longitudes de onda, y usar diferentes sustratos como fuente de carbono (carbohidratos y ácidos orgánicos derivados de desechos) para la producción de H_2 (Basak and Das, 2007). Además, el gas producido contiene del 80-95% de H_2 . Esta composición del biogás se explica por el metabolismo de las bacterias PNS. Cuando estas bacterias crecen en condiciones de iluminación, la producción y consumo de CO_2 pueden ocurrir simultáneamente. Estas bacterias fijan CO_2 a través del ciclo de Calvin para mantener el balance redox. La cantidad de CO_2 reciclado depende del grado de reducción de los sustratos orgánicos. El crecimiento fotoheterotrófico en anaerobiosis de las bacterias PNS sobre sustratos altamente reducidos depende de la fijación de CO_2 . De esta forma, el consumo de CO_2 altera la composición del biogás (McKinlay and Harwood, 2010a). El CO_2 remanente puede ser fácilmente removido (Adessi and De Philippis, 2014). Los sistemas de membranas pueden ser usados eficientemente para este fin (Bakonyi et al., 2013).

Se han realizado distintos estudios para evaluar los diferentes factores que afectan la producción de H_2 en el proceso fotofermentativo, incluyendo el tipo de sustrato y su concentración (Fang et al., 2005; Han et al., 2012), la relación C/N (Hillmer and Gest, 1977), pH (Fang et al., 2005), longitud de onda (Uyar et al., 2007; Wang et al., 2013), intensidad luminosa (Uyar et al., 2007; Argun and Kargi, 2010b; Seifert et al., 2010; Pintucci et al., 2013) y protocolos de iluminación (Uyar et al., 2007; Eroglu et al., 2010). Sin embargo, las conversiones de sustrato siguen siendo bajas (<60%) (Eroglu et al., 2010; Tian et al., 2010). Algunos autores han mostrado que es posible incrementar la conversión del sustrato (Liao et al., 2010; Liu et al., 2010), reportando valores >75%. Para lograr estos resultados se requiere mantener

una máxima actividad de la enzima, una relación C/N favorable y una distribución uniforme de la luz a través del cultivo (Basak et al., 2014).

Los procesos con células inmovilizadas presentan distintas ventajas: el sistema puede operar en fase exponencial por un largo periodo de tiempo, requieren menos espacio y volumen, tienen alta estabilidad catalítica y resistencia a toxinas e inhibidores enzimáticos, se puede mantener una mayor concentración de biomasa por unidad de volumen de reactor en comparación con los sistemas de biomasa suspendida y permite una fácil recuperación y reúso de las células (Gosse et al., 2010; Zagrodnik et al., 2013; Basak et al., 2014). Por ejemplo, la R_{H_2} incrementó de 15.9 a 26.6 mL H_2 /Lh cuando un cultivo suspendido de *R. palustris* fue inmovilizado en arcilla (Chen et al., 2007). La tolerancia al amonio incrementó cuando una cepa de *R. sphaeroides* se inmovilizó en geles de quitosano, polietilenimina, yoduro de trimetil amonio-glicol quitosano y poli-L-lisina (Zhu et al., 1999b).

Se ha evaluado la inmovilización por atrapamiento de *R. rubrum* en agar y agarosa (von Felten et al., 1985), *R. faecalis* en agar (Liu et al., 2009) y *R. palustris* en alcohol polivinílico, alginato de sodio y carragenina (Wang et al., 2013). Sin embargo, la inmovilización en superficie (biopelículas) parece ser más conveniente para fotofermentación debido a que ofrece una menor resistencia a la transferencia de masa, mejor estabilidad de operación y más fácil penetración de la luz que la inmovilización por atrapamiento (Tian et al., 2010; Guo et al., 2011). La evaluación de soporte para la formación de biopelículas incluye *R. sphaeroides* sobre vidrio poroso (Tsygankov et al., 1994) o fibra de vidrio (Tekucheva et al., 2011) y filtros de vidrio poroso (Zagrodnik et al., 2013, 2015), *R. palustris* sobre carbón activado, sílica gel y arcilla (Chen et al., 2007, 2008b), polimetilmetacrilato (Zhang et al., 2010), láminas de vidrio (Liao et al., 2010), perlas de vidrio (Tian et al., 2010), fibra óptica (Guo et al., 2011) y *R. faecalis* sobre fibras de carbón (Xie et al., 2012a). Se ha estudiado la estabilidad del proceso a largo plazo usando *R. palustris* inmovilizada en látex (167 días) (Gosse et al., 2010) y *R. sphaeroides* sobre vidrio poroso (70

días) (Zagrodnik et al., 2015), con R_{H_2} de 2.9 y 12.7 mL/Lh, respectivamente. Usando *R. palustris* inmovilizada sobre alcohol polivinílico, alginato y carragenina, Wang et al. (2013) reportaron altos valores de R_{H_2} (hasta 60 mL/Lh). Sin embargo, los principales inconvenientes de estos estudios son el incremento de los costos por las técnicas de inmovilización, necesidad de tratamiento de las superficies de los soportes y el uso de cultivos puros que requiere esterilización. Por lo anterior, es necesario encontrar soportes económicos, que requieran pretratamientos mínimos de las superficies y el uso de cultivos mixtos que no necesiten esterilización.

Esta sección presenta la evaluación de tres diferentes materiales de soporte, incluyendo una fibra natural de bajo costo, para la inmovilización de un consorcio de bacterias PNS productor de H_2 . El principal objetivo fue identificar el soporte que permitiera la mayor cantidad de células inmovilizadas por volumen de soporte y la más alta producción de H_2 usando un medio sintético conteniendo acetato y butirato de sodio como fuente de carbono.

4.2 Estrategia Experimental

4.2.1 Consorcio bacteriano y condiciones de cultivo

El consorcio utilizado fue aislado del ánodo de un sistema bioelectroquímico (Ruiz et al., 2014). Las bacterias se obtuvieron raspando el ánodo del sistema. El inóculo se cultivó en condiciones anaerobias (30-35°C y $pH_i = 6.8$) en medio de crecimiento (Sección 3.3.1). Para la iluminación se utilizaron lámparas fluorescentes y de tungsteno (60 W) (5 klux). La biomasa fue cosechada a las 100 h de cultivo y se reinició un nuevo ciclo de cultivo hasta obtener el consorcio microbiano de bacterias PNS en una concentración adecuada (1.0 ± 0.1 g/L SSV).

Para el crecimiento del inóculo para la inmovilización se utilizó el mismo medio de crecimiento (Sección 3.3.1), con acetato y butirato como fuente de

carbón, glutamato como fuente de N, una relación C/N = 60 y pH_i = 6.8. Se utilizó argón para desplazar el O₂. El cultivo se hizo en frascos de 1 L con agitación magnética (32 °C y 5 klux). La biomasa fue cosechada por centrifugación a 3500 rpm por 15 min (Centrífuga Solbat, C40, México).

4.2.2 Materiales de soporte

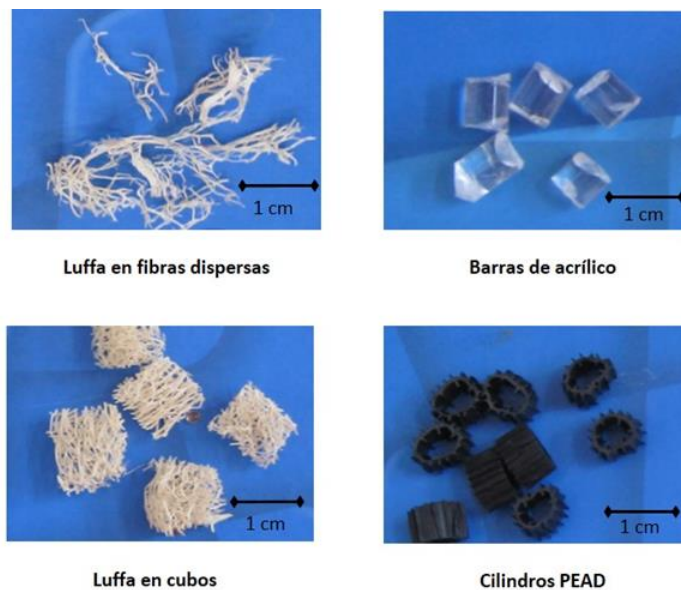


Figura 4.1. Soportes evaluados para la inmovilización del consorcio

Se probaron tres diferentes materiales como posibles soportes para la inmovilización del consorcio (Figura 4.1). Los materiales fueron barras de acrílico (6 mm de diámetro X 7 mm de longitud, en promedio), cilindros de polietileno de alta densidad (PEAD) (BCN 009 plus, 2H Germany) y luffa como fibras dispersas y cubos de aproximadamente 1 cm. Las fibras de luffa, al ser fibras naturales (*Luffa cylindrica*) son ambientalmente amigables por ser renovables. Las propiedades de las fibras naturales incluyen su baja densidad, resistencia considerable, flexibilidad, fácil procesamiento, resistencia a la corrosión, son reciclables y de bajo costo, lo que las hace materiales económica y socialmente benéficos. Se determinaron las densidades de los materiales de soporte usando una balanza analítica (Ohaus

Adventurer Pro AV114C) para determinar su peso y tubos Falcon para determinar el volumen por desplazamiento de agua. Para determinar la relación área/volumen (A/V), las fibras fueron teñidas con azul de metileno y la medición del diámetro se hizo a través de un microscopio (Leica DM 500, Optical Len ICC50 HD). Los materiales plásticos (barras de acrílico y cilindros de PEAD) se sumergieron en agua residual por tres días para oxidar su superficie y favorecer la formación de la biopelícula. Posteriormente fueron lavados antes de usarse en la fotofermentación.

4.2.3 Inmovilización del consorcio

Para la colonización, 0.7 g de luffa (en fibras y cubos), 5.0 g de cilindros de PEAD y, 7.0 g de barras de acrílico, fueron colocados en botellas serológicas de 120 mL con 75 mL de medio de crecimiento y 100 mg de SSV/L como inóculo. Las botellas fueron cultivadas a 32 ± 2 °C por 29 días con iluminación continua a 7 klux y agitación orbital a 100 rpm (Barnstead Lab-Line SHKE2000). Los cultivos fueron iluminados con lámparas LED (590 nm) y de tungsteno. Como control, se usaron cultivos sin soporte (biomasa suspendida) con las mismas condiciones de cultivo. Durante el proceso de inmovilización se midió la producción de biogás y la composición del mismo. Al final del periodo de inmovilización, se determinó la concentración de biomasa suspendida, la DQO_s y el pH del medio.

4.2.4 Producción de hidrógeno por el consorcio inmovilizado

Para evaluar la producción de H₂ por la biomasa inmovilizada, se tomó una muestra de los soportes colonizados. Estos se lavaron con medio fresco para eliminar la biomasa suspendida. Se colocó la cantidad de soporte necesario para tener una concentración inicial de 15 mg SV/L. Se agregó medio de crecimiento fresco en dilución 1:10 (0.148 g/L de acetato de sodio, 0.330 g/L de butirato de sodio y 0.037 g/L de glutamato de sodio), para mantener una relación SV/DQO similar a la usada durante la colonización. Las condiciones de cultivo fueron iguales a las descritas en

la Sección 4.2.3. Se realizaron cuatro ciclos de cultivo con la biomasa inmovilizada con un tiempo total de 18 días. Durante este periodo se determinó el volumen y la composición del biogás. Al final del experimento se cuantificó el pH, DQO_s y la concentración de biomasa.

4.2.5 Métodos analíticos

Las técnicas y equipos utilizados para las distintas determinaciones se describen en el Capítulo 3: intensidad luminosa y pH (Sección 3.8), biomasa suspendida y fija como SV (Sección 3.4), DQO_s (Sección 3.5.2), volumen y composición del biogás (Sección 3.7).

La producción de H₂ fue ajustada al modelo de Gompertz modificado (4.1) (Mu et al., 2006):

$$H = H_{m\acute{a}x} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{2.71828 R_{m\acute{a}x}}{H_{m\acute{a}x}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (4.1)$$

donde H (mL H₂/g SV) es la cantidad de H₂ acumulado en el cultivo en el tiempo t (h), H_{máx} (mL H₂/g SV) es el volumen máximo de H₂ producido, R_{máx} (mL H₂/g SV/h) es la velocidad máxima de producción de H₂ y λ (h) es la duración de la fase de latencia.

4.2.6 Extracción de ADN y pirosecuenciación

Para la identificación de las principales especies en el consorcio, se tomó una muestra del inóculo inicial y se realizó la extracción de ADN y pirosecuenciación del mismo, de acuerdo con lo descrito en la Sección 3.9. Para la pirosecuenciación, se sometió a análisis un volumen de 30 μL de extracto con una concentración de 50.1 ng/μL. Para la secuenciación de los amplicones se usó la plataforma 454-Genome

Sequencer FLX Titanium (Roche, Suiza). Se usaron los primer 28F y 519R. Se generaron un total de 56,843 secuencias. Para la identificación de las especies se usó la base de datos del NCBI.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Caracterización de los soportes

Los soportes fueron seleccionados por su alta relación A/V y su capacidad para mantenerse en suspensión en el medio de cultivo. Adicionalmente, se consideró la necesidad de que los materiales utilizados permitieran una adecuada distribución de la luz. La Tabla 4.1 muestra los resultados de la densidad y relaciones A/V para los soportes evaluados. De los tres diferentes soportes, la luffa presentó la más baja densidad y más alta relación A/V, lo que provee una mayor superficie para la inmovilización y facilita el mezclado. Las fibras son materiales compuestos principalmente de fibrillas de celulosa y una matriz de lignina/hemicelulosa (66% de celulosa, 17% de hemicelulosa y 15% de lignina) (Guimarães et al., 2009). En cuanto a sus propiedades mecánicas, su módulo de Young (23 GPa) y su resistencia (103 MPa) la hacen comparable a la madera (Chen et al., 2014).

Tabla 4.1. Características de los materiales de soporte

Material de soporte	Densidad (g/cm ³)	A/V (cm ² /cm ³)
Luffa	0.82	244.0
Barras de acrílico	1.25	9.6
Cilindros de PEAD	0.92	68.7

4.3.2 Producción de hidrógeno durante la colonización

La producción de H₂ por gramo de sólido volátil, SV (biomasa suspendida y fija), fue ajustada al modelo de Gompertz (Figura 4.2). Los parámetros de la ecuación se muestran en la Tabla 4.2. Aunque las producciones específicas promedio de H₂

(L H₂/g SV) fueron mayores en el control y los cilindros PEAD, el crecimiento microbiano fue menor (g SV). Debido a que el control es con biomasa suspendida y la cantidad de biomasa adherida a los cilindros PEAD (Figura 4.3) fue baja, la mayor parte de la biomasa en estos cultivos se encontraba como suspendida lo que pudo limitar la iluminación y por tanto el crecimiento. Sin embargo, la disminución en el crecimiento pudo permitir que una mayor cantidad de sustrato se usará en la producción de H₂. Por otro lado, a pesar de que los mayores valores de H_{máx} se consiguieron con el control y los cilindros PEAD, las velocidades de producción (R_{máx}) fueron menores a las conseguidas con la luffa en fibras y las barras de acrílico, lo que se reflejaría en un mayor tiempo de proceso. La máxima velocidad de producción de H₂ se obtuvo con las barras de acrílico 20.2 mL H₂/g SV/h. Las velocidades máximas de producción de H₂ para los otros soportes y el control fueron similares (15.7-17.0 mL H₂/g SV/h). Los cultivos con la luffa en cubos tuvieron una menor velocidad y producción de H₂ que los alcanzados con la luffa en fibras dispersas. La diferencia entre las dos formas se explica por una diferente distribución de la luz. La luffa en cubos tiene una estructura más compacta que

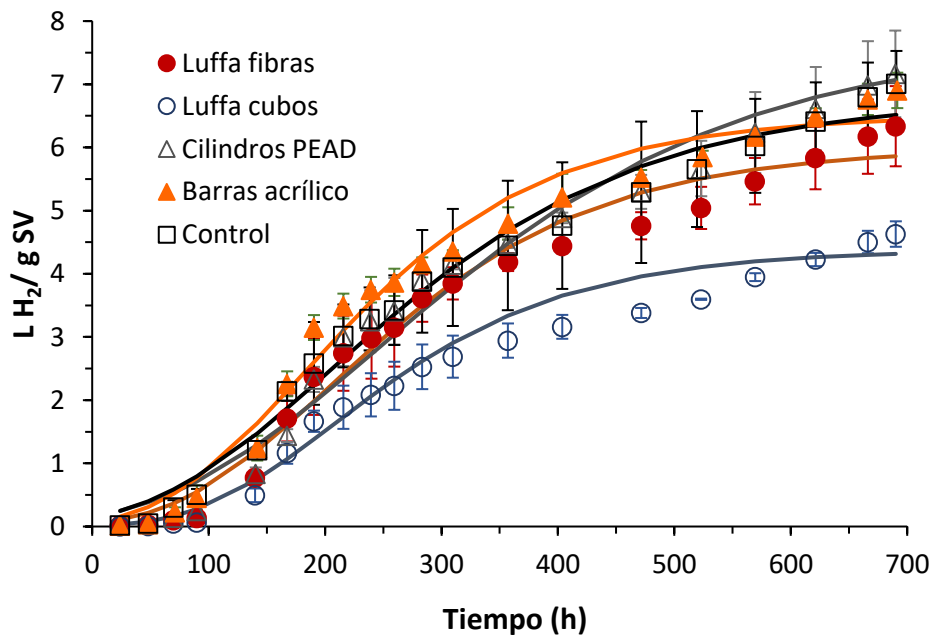


Figura 4.2. Producción acumulada de H₂ en el tiempo y ajuste de Gompertz

puede bloquear el paso de luz a través del soporte. Para todos los cultivos, se observó un incremento de pH de 0.3 ± 1 , lo que se asocia a la producción de amonio. El porcentaje de remoción de DQO (promedio de $72.2 \pm 4.2\%$) fue similar con todos los soportes evaluados y el control.

Tabla 4.2. Parámetros de Gompertz, remoción de DQO y pH final durante los experimentos de colonización de los soportes

Material de Soporte	Parámetros de Gompertz			Δ DQO %	pH final
	$H_{m\acute{a}x}$ (L H ₂ /g SV)	$R_{m\acute{a}x}$ (mL H ₂ /g SV/h)	λ (h)		
Luffa en fibras	6.0	17.0	73.7	71.6	7.1
Luffa en cubos	4.4	14.0	92.0	69.4	7.2
Barras de acrílico	6.5	20.2	61.5	70.9	7.2
Cilindros de PEAD	7.7	15.7	66.0	79.6	7.2
Control	6.8	16.4	54.1	69.4	7.1

4.3.3 Biomasa inmovilizada

Los resultados de la cuantificación de la biomasa adherida al soporte se muestran en la Figura 4.3. Después de la inmovilización, la luffa en fibras dispersas presentó la mayor cantidad de biomasa fijada por unidad de volumen de soporte (8.0 ± 1.7 mg SV/cm³). Este resultado se correlaciona con la mayor relación A/V. Cuando los soportes fueron transferidos a medio fresco para evaluar la producción de H₂ con la biomasa inmovilizada, la biopelícula formada sobre los soportes incrementó entre 2.5 y 4.5 veces. Al final del experimento, la biomasa adherida a las fibras de luffa fue 19.6 ± 1.5 mg SV/cm³, 1.8 veces más que la observada para la luffa en cubos, 9.8 veces más que los cilindros de PEAD y 16.2 veces más que las barras de acrílico. Este incremento en la concentración de la biomasa fija fue previamente observado con *R. palustris* inmovilizada sobre filtros de vidrio poroso (Zagrodnik et al., 2013), donde se alcanzó una concentración de 19 mg/cm³, similar a la encontrada en este estudio con las fibras de luffa. Una menor concentración de biomasa se encontró con *R. sphaeroides* inmovilizada en vidrio poroso (11.2

mg/cm³). En comparación con este estudio, el vidrio poroso requirió modificación química para asegurar la formación de la biopelícula (Tsygankov et al., 1994).

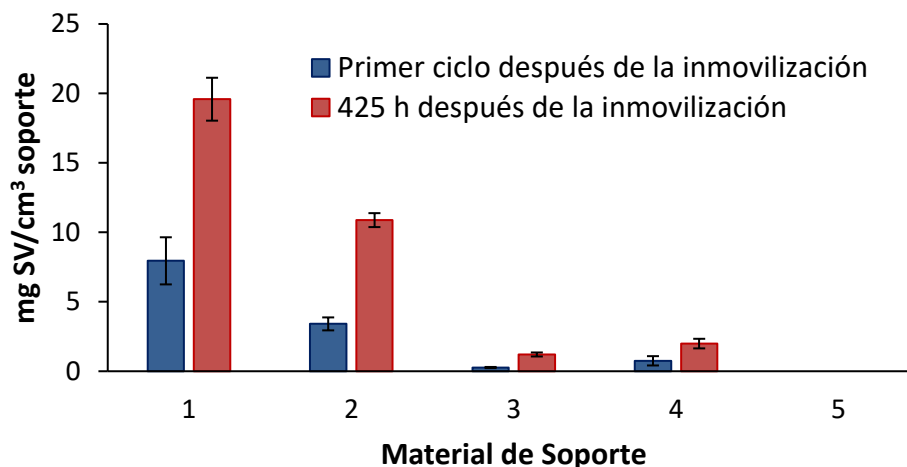


Figura 4.3. Cuantificación de la biomasa fija durante la evaluación de los soportes colonizados para la producción de H₂.

4.3.4 Producción de hidrógeno por el consorcio inmovilizado

En la Figura 4.4 se muestran los resultados de la evaluación de la producción de H₂ usando los soportes colonizados. Durante el primer ciclo en lote, la producción acumulada de H₂ fue menor que en los ciclos subsecuentes, que pudo deberse al periodo de adaptación de las bacterias y a una concentración celular en la biopelícula menor a la óptima. Zagrodnik et al. (2013) demostraron que este comportamiento se debe a la baja concentración celular en la biopelícula. La máxima producción específica de H₂ para los ciclos siguientes fue similar en todos los soportes evaluados (2.4-3.0 L H₂/g SV). En contraste con los experimentos de colonización, en estos la luffa como fibras dispersas y en cubos tuvieron producciones similares, debido a que la concentración de biomasa suspendida fue menor a la de los primeros experimentos, lo que resultó en una mejor distribución de la luz a través del cultivo. Las producciones específicas alcanzadas con las células inmovilizadas en luffa, fueron ligeramente mayores a las obtenidas con los

materiales plásticos, lo que puede indicar una mayor afinidad de las células hacia los materiales naturales. La luffa está compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. Patel et al. (2010) evaluaron la producción de H₂ a través de fermentación oscura con células inmovilizadas sobre materiales lignocelulósicos y PVC, y observaron que algunos materiales lignocelulósicos mejoraron la producción de H₂ al compararlos con las células inmovilizadas en PVC.

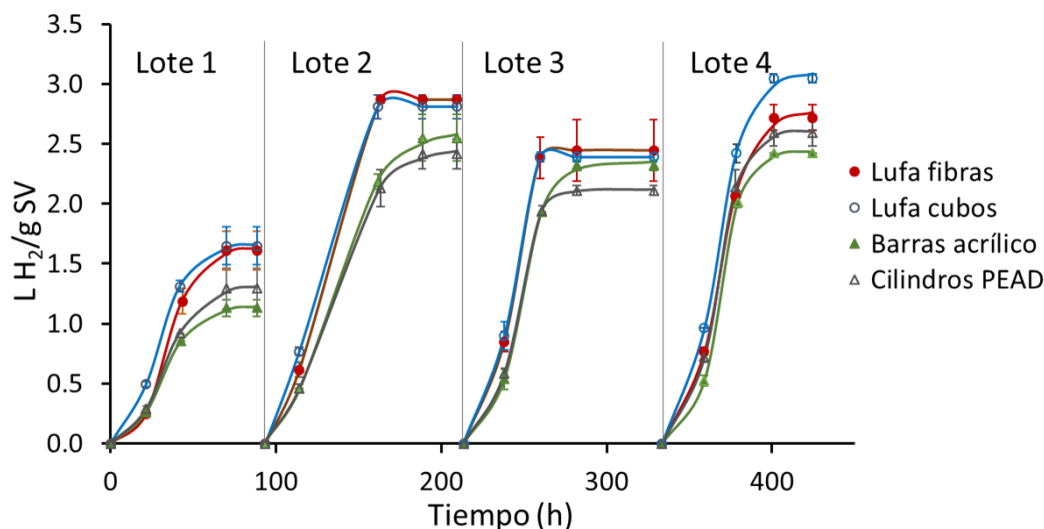


Figura 4.4. Producción de H₂ con la biomasa inmovilizada durante cuatro ciclos en lote (425 h)

La remoción de DQO alcanzada en las pruebas con la biomasa inmovilizada fueron similares a las obtenidas con los experimentos de colonización ($76 \pm 6.1\%$), que muestran un alto consumo de sustrato por los microorganismos. Los resultados de este estudio fueron comparados con los reportados por otros autores usando células inmovilizadas en biopelículas (Tabla 4.3). Las velocidades de producción obtenidas se encuentran dentro de las reportadas para otros materiales de soporte. Sin embargo, la producción acumulada de H₂ con el consorcio inmovilizado sobre la luffa fue mayor a la de los estudios reportados, con la ventaja adicional de que el consorcio inmovilizado no requirió esterilización o pretratamientos.

Tabla 4.3. Comparación de la producción de H₂ utilizando diferentes materiales de soporte

Especie microbiana	Material de soporte	R _{H2} (mL/Lh)	H _{máx} (L/L)	Referencia
<i>R. sphaeroides</i>	Filtro de vidrio poroso	7.4-59	0.7-1.4	(Zagrodnik et al., 2013)
<i>R. palustris</i>	Arcilla	38	1.54	(Chen et al., 2007)
	Sílica gel	35	1.79	
	Carbón activado	29	1.37	
<i>R. palustris</i>	Arcilla	39	3.19	(Chen et al., 2008b)
<i>R. faecalis</i>	Fibras de carbón	33	3.45	(Xie et al., 2012a)
Consorcio bacteriano	Fibras de luffa	14	4.88	Este estudio

4.3.5 Comunidad bacteriana en el consorcio productor de hidrógeno

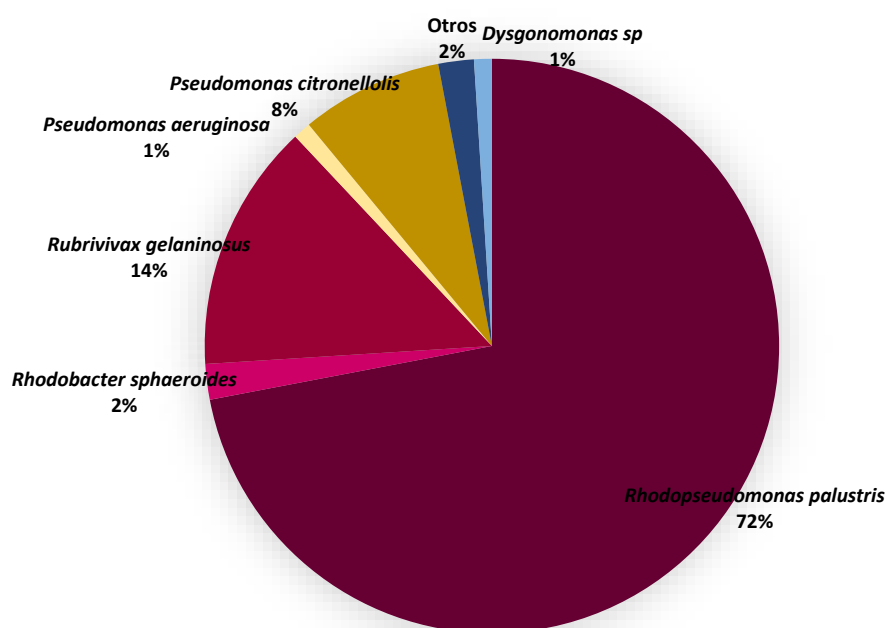


Figura 4.5. Caracterización microbiana del consorcio productor de H₂

El análisis de ADN mostró que la principal especie bacteriana en el consorcio fue *Rhodopseudomonas palustris* (72% de las secuencias) (Figura 4.5). Se ha reportado previamente que esta especie es capaz de metabolizar los ácidos acético y butírico con producción de H₂ (Chen et al., 2008a; Lo et al., 2011). Algunas

secuencias (2%) mostraron similitud con *R. sphaeroides*, una bacteria fototrófica que también es capaz de producir H₂ a partir de distintas fuentes de carbono, incluidas acetato y butirato (Tekucheve et al., 2011; Han et al., 2012). *Rubrivivax gelatinosus*, otra especie de bacteria PNS, también fue detectada en el consorcio (14%). Sin embargo, aunque se ha reportado que esta especie es capaz de crecer usando acetato y butirato como sustrato, no se ha probado que pueda producir H₂ a partir de ellos (Li and Fang, 2008).

4.4 Conclusiones

El uso de un consorcio inmovilizado de fotobacterias para la producción de H₂ fue evaluado usando materiales de soporte económicos. La producción de H₂ observada varió entre 14 y 20 mL H₂/g SV/h. La principal especie productora de H₂ fue *Rhodopseudomonas palustris*. La productividad de H₂ está influenciada principalmente por la concentración de células en el material de soporte. Las fibras de luffa se seleccionaron como el soporte más adecuado para el consorcio productor de H₂ debido a que permitieron una mayor cantidad de biomasa inmovilizada por volumen de soporte (19.6 ± 1.5 mg SV/cm³) y una mejor distribución de la luz. El porcentaje de remoción de DQO con el consorcio bacteriano fue de $76 \pm 6.1\%$.

Capítulo 5. Optimización de las condiciones de iluminación y pH de un consorcio inmovilizado de bacterias PNS

Resumen

La producción de H₂ por fotofermentación está influenciada por distintos factores, incluyendo la fuente de iluminación, la intensidad luminosa y el pH inicial (pH_i). Este estudio evalúa el efecto de tres diferentes fuentes de iluminación (tungsteno, fluorescente y LED amarillo) sobre la producción de H₂ bajo condiciones fijas de intensidad y pH_i (125 W/m² y 6.7), usando un consorcio inmovilizado de bacterias PNS en un medio compuesto por acetato, butirato y propionato. Las lámparas de tungsteno fueron seleccionadas como la fuente de iluminación más adecuada favoreciendo una mayor producción de H₂. Con esta fuente de iluminación se realizó la optimización de la intensidad luminosa y el pH inicial a través de una Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) con un Diseño Central Compuesto (DCC), a fin de incrementar la máxima producción de H₂ (H_{máx}), la velocidad de producción (R_{máx}) y la remoción de DQO (ΔDQO, %). Con la MSR se determinó que se puede alcanzar un H_{máx} = 3.99 L H₂/L, R_{máx} = 15.2 mL H₂/L/h y ΔDQO = 92.9% a 221 W/m² y un pH_i = 6.5. La verificación experimental a las condiciones óptimas determinadas por el modelo mostró un error menor al 5% para las tres variables de respuesta, lo que demuestra la confiabilidad del modelo de regresión.

Artículos derivados de este capítulo:

Guevara-López E., Buitrón G. Optimization of lighting conditions and initial pH in photofermentation to improve H₂ production and organic matter consumption with an immobilized PNSB consortium (*En preparación*).

5.1 Introducción

La producción de H₂ por fotofermentación es catalizada por la nitrogenasa en ausencia de nitrógeno molecular. La temperatura y pH óptimo para esta enzima han sido reportadas como 30°C y 7.0, respectivamente (Koku et al., 2002). La síntesis de la enzima también es influenciada por las condiciones de iluminación. Un incremento en la intensidad luminosa puede mejorar la síntesis de ATP y, por lo tanto, incrementa la actividad o síntesis de la enzima (Vignais et al., 1985). Además, los ciclos luz/oscuridad pueden mejorar la estabilidad de la enzima. Por otro lado, el proceso fotofermentativo depende de dos principales pigmentos: bacterioclorofilas (absorben a 590, 805, 855 y 875 nm) y carotenoides (absorben a 450, 477 y 510 nm) (Cogdell et al., 1999; Adessi and De Philippis, 2014). El espectro de absorción de las bacterias PNS se muestra en la Figura 5.1. Las condiciones ambientales influyen en la composición de estos pigmentos, principalmente el oxígeno y las condiciones de iluminación (Cohen-Bazire et al., 1957).

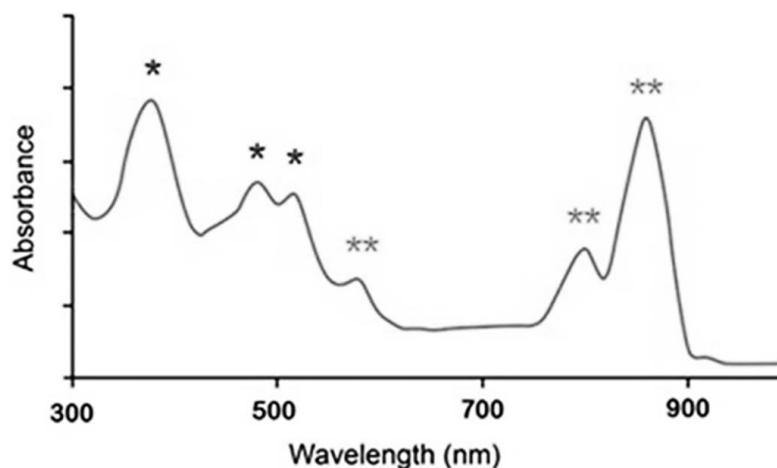


Figura 5.1. Espectro típico de absorción de las bacterias PNS dado por los carotenoides (*) y las bacterioclorofilas (**). Tomado de Adessi y De Philippis (2014).

Existen diversos estudios que evalúan las condiciones que permiten incrementar la producción de H₂ y el consumo de sustrato en la fotofermentación con bacterias PNS, incluyendo pH, fuente de iluminación e intensidad luminosa. Los resultados dependen de la cepa utilizada, fuente de carbono, diseño del reactor,

entre otros factores (Uyar et al., 2007; Argun and Kargi, 2010b; Wang et al., 2013; Lazaro et al., 2015).

No obstante, la mayor parte de los estudios optimizan variable por variable, descartando la interacción entre ellas. Los métodos estadísticos como la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) son útiles para evaluar la interacción entre variables y optimizar la producción de H₂ sin la necesidad de un excesivo número de experimentos (Wang and Wan, 2009a). Esta metodología ha sido poco utilizada en la fotofermentación para producción de H₂, optimizando la concentración de distintos componentes en el medio de cultivo (Cardeña et al., 2015, 2017; Basak et al., 2016); la concentración de biomasa inicial y la intensidad luminosa (Shi and Yu, 2005), la concentración inicial de sustrato, SSV e intensidad luminosa (Castillo et al., 2012; Akman et al., 2015), la temperatura y el pH inicial (Assawamongkholisiri and Reungsang, 2015) y la relación entre microorganismos, concentración de buffer y sustrato (Hitit et al., 2017) en un co-cultivo de *Clostridium butyricum* y *Rhodospseudomonas palustris*.

Aunque se ha probado que la intensidad luminosa y el pH tienen efecto sobre la síntesis y la actividad de la nitrogenasa y, por lo tanto, sobre la producción de H₂, el efecto combinado y la optimización simultánea de estas dos variables ha sido muy poco estudiado. Jamil et al. (2009), utilizaron MSR y un diseño Box-Behnken para evaluar el efecto simultáneo de cinco variables: pH, intensidad luminosa, concentración del inóculo, velocidad de agitación y concentración de sustrato sobre la producción acumulada de H₂ (mL) y la reducción de DQO (%) con un cultivo puro de *R. palustris* creciendo en efluente de la producción de aceite de palma. En su estudio observaron que la concentración de sustrato, la intensidad luminosa y la velocidad de agitación tenían efecto sobre la producción acumulada de H₂, pero no encontraron efecto de las variables evaluadas sobre la reducción de DQO. También se observó que cuando la concentración de sustrato incrementó fue necesario incrementar la intensidad luminosa para lograr una mayor producción de H₂. Debido

a que este estudio, al igual que los otros mencionados, fue realizado con biomasa suspendida, el crecimiento celular también pudo afectar la distribución de la luz en el cultivo.

El uso de biomasa inmovilizada puede prevenir el efecto sombra (“shading effect”) que se presenta en cultivos con biomasa suspendida cuando la concentración celular incrementa y, por lo tanto, mejorar las condiciones de iluminación en el cultivo (Akroum-Amrouche et al., 2011). Además, también se ha demostrado que la inmovilización puede disminuir efectos inhibitorios (Zhu et al., 1999a) e incrementar la producción de H₂ (Chen and Chang, 2006). Por otro lado, los estudios con MSR se han realizado con cultivos puros. El uso de consorcios microbianos puede ser útil para degradar sustratos complejos y evitar esterilización (Cardeña et al., 2015; Lazaro et al., 2015).

El objetivo principal de este trabajo es determinar la mejor fuente de iluminación artificial para la fotofermentación y optimizar la intensidad luminosa y el pH inicial para incrementar la producción de H₂ y el consumo de sustrato, usando un consorcio microbiano inmovilizado de bacterias PNS en un medio conteniendo ácido acético, propiónico y butírico, a través de una MSR con un Diseño Central Compuesto (DCC).

5.2 Estrategia Experimental

5.2.1 Inóculo y condiciones de cultivo

El consorcio productor de H₂ fue descrito en la Secciones 4.2.1 y 4.3.5, en éste se identificaron tres especies de bacterias PNS: *Rhodopseudomonas palustris* (72%), *Rubrivivax gelatinosus* (14%) y *Rhodobacter sphaeroides* (2%). El consorcio fue precultivado en medio de crecimiento (Sección 3.3.1). El pH inicial fue ajustado a 6.7, usando HCl 2 N. Se usó vacío para obtener condiciones anaerobias en el

medio. La temperatura se mantuvo en $32 \pm 2^\circ\text{C}$ y la iluminación fue suministrada por lámparas de tungsteno a 5 klux (333 W/m^2). La biomasa se recolectó por centrifugación (Centrífuga Solbat C-40) a 3500 rpm por 15 min.

5.2.2 Inmovilización

El consorcio fue inmovilizado en fibras de *luffa*, tal como se describe en la Sección 4.2.3. Al final del periodo de inmovilización, se cuantificó la concentración de biomasa adherida al soporte.

Con la finalidad de observar la formación de la biopelícula sobre el soporte, se adquirieron imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés). Se tomó una muestra de los soportes a las cinco semanas de cultivo. El soporte con la biopelícula fue deshidratado en soluciones de glutaraldehído y etanol, de acuerdo a como se menciona en el método del glutaraldehído (Talbot and White, 2013). Posteriormente, se tomaron algunas muestras del soporte deshidratado para cubrir las con oro (sputter coate Denton Vacuum, Desk II). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio electrónico de barrido (Carl Zeiss EVO 50).

5.2.3 Selección de la fuente de iluminación

Los experimentos fueron realizados con medio de producción de H_2 (Sección 3.3.2), con acetato, propionato y butirato como fuente de carbono y glutamato como fuente de nitrógeno. Se utilizó la cantidad de soporte necesaria para obtener una concentración inicial de 300 mg SV/L y ésta se colocó en botellas serológicas de 120 mL. Se adicionaron 90 mL de medio de cultivo y el oxígeno fue desplazado aplicando vacío. La temperatura se mantuvo en $32 \pm 2^\circ\text{C}$ y las botellas fueron mezcladas a 100 rpm con agitación orbital (Ovan OM10E). Se evaluaron tres fuentes de iluminación: fluorescente, tungsteno y LED amarillo a una intensidad luminosa de 125 W/m^2 . Los espectros de las lámparas fueron adquiridos con ayuda

de un espectrofotómetro UV/VIS (Ocean Optics USB 4000) (Figura 5.2). Los cultivos se llevaron a cabo en lote, con una duración de tres semanas.

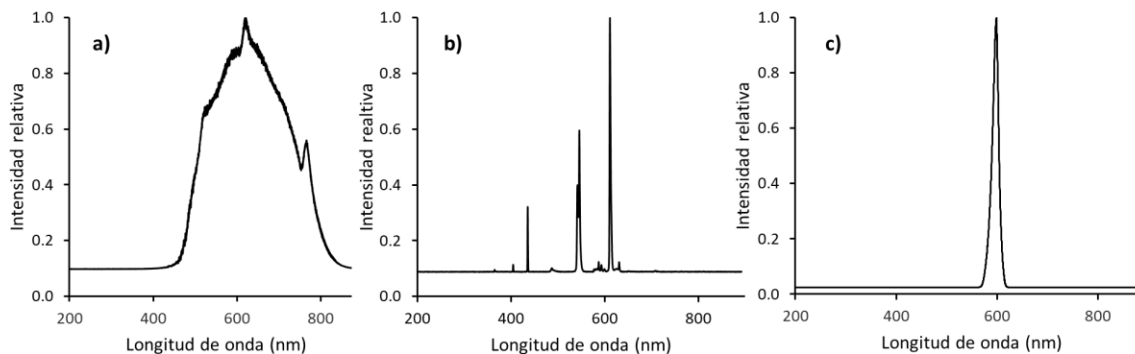


Figura 5.2. Espectros de emisión de las fuentes de luz evaluadas. a) Tungsteno, b) Fluorescente y c) LED amarillo

5.2.4 Optimización de la intensidad luminosa y el pH inicial

La optimización de la intensidad luminosa y el pH inicial se realizó con la fuente de luz que permitió la mayor producción de H₂ en el experimento anterior (Sección 5.2.3). Se utilizó el mismo medio de cultivo que en el experimento de la selección de la fuente de iluminación. El volumen de medio, la cantidad de inóculo, temperatura y velocidad de agitación también se mantuvieron igual al experimento anterior. Los experimentos se realizaron de acuerdo con un DCC, el cual se describe más adelante (Sección 5.2.6). El pH_i fue ajustado con soluciones de HCl (2N) y NaOH (2N). La intensidad luminosa fue regulada controlando la distancia de la fuente de iluminación a la superficie de las botellas.

El volumen y composición del biogás producido fue determinado a lo largo de la fotofermentación y las cinéticas fueron ajustadas al modelo de Gompertz modificado (5.1) (Mu et al., 2006).

$$H = H_{m\acute{a}x} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{m\acute{a}x} e}{H_{m\acute{a}x}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (5.1)$$

donde H (mL H_2 /L) es el volumen de H_2 acumulado al tiempo t (h), $H_{\text{máx}}$ (mL H_2 /L) es el volumen máximo de H_2 producido, $R_{\text{máx}}$ (mL/Lh) es la velocidad máxima de producción de H_2 y λ (h) es la duración de la fase de latencia. Los resultados se reportan en condiciones estándar de presión y temperatura.

Las fermentaciones se detuvieron una vez que la producción de H_2 cesó. Al final de las mismas, se tomaron muestras del efluente para determinar la DQO_s y calcular la DQO removida (Δ DQO, %)

5.2.5 Métodos analíticos

Las técnicas analíticas se describieron anteriormente: intensidad luminosa y pH (Sección 3.8), concentración de biomasa (Sección 3.9), DQO_s (Sección 3.5.2), cantidad y composición del biogás (Sección 3.7).

5.2.6 Diseño Experimental

Para evaluar el efecto de la fuente de iluminación y seleccionar la más adecuada para la producción de H_2 , se realizó un ANOVA (análisis de varianza) de un factor con un nivel de significancia del 95%.

Una vez seleccionada la fuente de iluminación, se evaluó el efecto del pH_i y la intensidad luminosa sobre $H_{\text{máx}}$, $R_{\text{máx}}$ y Δ DQO (%). Se usó un DCC. El DCC es un diseño factorial fraccionado de cinco niveles (Box and Wilson, 1951), que se usa para estimar la relación entre la variable de respuesta y los factores clave, y localizar las condiciones óptimas a través de un polinomio de segundo grado (Wang and Wan, 2009a). Las variables independientes o factores fueron el pH_i (X_1) y la intensidad luminosa (X_2). Los niveles probados se muestran en la Tabla 5.2.

Para la creación del diseño, el análisis de los datos y la estimación de los coeficientes del polinomio de segundo grado, se usaron los softwares Statgraphics Centurion v15.1.0.2 © StatPoint Inc. y Statistica 12. StatSoft, Inc. Se utilizó una prueba t con un nivel de significancia del 95% para determinar los efectos significativos sobre las variables dependientes.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Observación de la biopelícula (imágenes SEM)

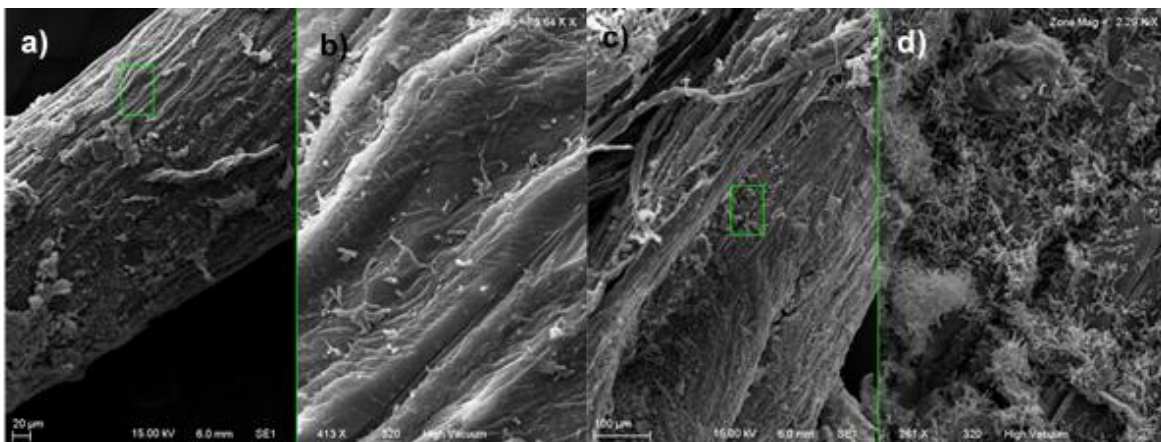


Figura 5.3. Micrografías de la biopelícula formada sobre las fibras de luffa. a) Imagen de una fibra de luffa colonizada adquirida a 413X. b) Recuadro verde de la imagen a) amplificado a 3640X. c) Imagen de una fibra de luffa mostrando un área con alta colonización, adquirida a 261X. d) Recuadro verde de la imagen c) amplificado a 2290X

Las imágenes adquiridas por SEM permitieron la observación del crecimiento microbiano sobre las fibras de luffa (Figura 5.3). Se pudieron observar diferentes grados de colonización, lo que pudo asociarse con diferencias en la estructura de la fibra (rugosidad) o variaciones en la luz incidente sobre ellas. Las células se distinguen como bacilos (bastones), morfología característica de *R. palustris*. Las diferencias en tamaño se han asociado previamente a la edad del cultivo (van Niel, 1944) y la intensidad luminosa (Liao et al., 2010).

5.3.2 Selección de la fuente de iluminación

Los resultados de la producción de H₂ y la remoción de DQO con las tres fuentes de iluminación (tungsteno, fluorescentes y LED amarillos) a 125 W/m² y 6.7 se presentan en la Tabla 5.1. El análisis estadístico (Anexo A.1) mostró que el tipo de iluminación tiene un efecto significativo sobre la producción de H₂; sin embargo, no se observó efecto sobre la remoción de DQO. Las lámparas de LED amarillo no fueron apropiadas para la producción de H₂ con el consorcio inmovilizado a 125 W/m², por lo que fueron evaluadas a 110 y 190 W/m². No se observó producción de H₂ en las intensidades evaluadas. Otros estudios han evaluado el uso de lámparas LED amarillo para la fotofermentación con bacterias PNS (Liao et al., 2010; Wang et al., 2013), reportando que es adecuada para la producción de H₂. Los resultados de la literatura se justifican por el espectro que proveen estas lámparas, emitiendo a una longitud de onda de 590 nm (Figura 5.2c), que se traslapa con uno de los picos de absorción de las bacterioclorofilas (Cohen-Bazire et al., 1957; Adessi and De Philippis, 2014). Incluso usando un cultivo inmovilizado de *R. palustris*, la longitud de onda de 590 nm resultó más adecuada para la producción de H₂ al compararla con 470 y 650 nm (Tian et al., 2010). Sin embargo, el espectro de absorción puede diferir entre especies o cepas de bacterias. Las condiciones ambientales, principalmente el oxígeno, la calidad e intensidad de la luz, pueden alterar la síntesis de pigmentos y por tanto el espectro de absorción (Gall and Robert, 1999). La falta de pigmentos afecta la producción de H₂ (Cohen-Bazire et al., 1957).

Tabla 5.1. Producción de H₂ y remoción de DQO con las tres lámparas evaluadas a 125 W/m² y pH_i 6.7

Lámpara	mL H ₂ /L	ΔCOD (%)
Tungsteno	3080±190	93±4
Fluorescente	1120±130	71±8
LED amarillo	0	82±3

En cuanto a las lámparas fluorescentes, su espectro muestra picos a 435, 488, 545 y 611 nm (Figura 5.2b). Este tipo de lámparas también se ha usado en la producción de H₂ (Lazaro et al., 2012; Hay et al., 2017). La producción de H₂ puede relacionarse con los picos de 435 y 488 nm, cubriendo la longitud de onda de los pigmentos carotenoides. Sin embargo, la producción de H₂ con las lámparas fluorescentes fue menor a la alcanzada con las lámparas de tungsteno. En un estudio previo se observó que aun cuando las lámparas favorecieron el crecimiento celular, la concentración de pigmentos carotenoides sintetizados fue baja (Kuo et al., 2012). En la Figura 5.2a se observa que las lámparas de tungsteno proveen un espectro continuo (300-900 nm), que cubre el espectro entero de absorción de los pigmentos fotosintéticos de las bacterias PNS, resultando en un incremento en la producción de H₂.

5.3.3 Optimización del pH inicial y la intensidad luminosa usando lámparas de tungsteno

Tabla 5.2. Matriz del Diseño Central Compuesto mostrando los niveles evaluados para pH e intensidad luminosa y los resultados para H_{máx}, R_{máx} y ΔDQO

Corrida	pH _i (X ₁)		Intensidad luminosa (X ₂)		H _{máx} (mL/L)	R _{máx} (mL/L/h)	ΔDQO (%)	pH _f
	Código	Real	Código	Real (W/m ²)				
1	-1	6.7	-1	125.3	3709	11.9	91.4	7.3
2	-1	6.7	1	366.7	2977	14.9	89.5	7.5
3	1	7.7	-1	125.3	2773	5.9	76.5	7.9
4	1	7.7	1	366.7	2555	10.3	80.8	8.4
5	-1.41421	6.5	0	246.0	3973	15.2	91.3	7.4
6	1.41421	7.9	0	246.0	2250	13.4	69.8	9.5
7	0	7.2	-1.41421	75.3	2235	4.6	84.3	7.4
8	0	7.2	1.41421	416.7	2381	9.1	78.2	8.5
9	0	7.2	0	246.0	4100	3.6	93.9	7.5
10	0	7.2	0	246.0	3794	3.1	92.3	7.4

El mayor volumen de H₂ producido fue alcanzado con las lámparas de tungsteno y, por lo tanto, estas fueron seleccionadas para la optimización del pH_i (X₁) y la intensidad luminosa (X₂) usando una MSR con un DCC. Los niveles del diseño experimental evaluados, así como los resultados, se muestran en la Tabla 5.2.

El análisis de varianza (Anexo A.2) demostró que los términos significativos para H_{máx} son X₁ y X₂² (p<0.05, 0.0212 y 0.0119, respectivamente). La ecuación polinomial para H_{máx}, que generó el análisis de regresión como una función del pH_i y la intensidad luminosa se presenta a continuación (5.2).

$$H_{máx} \left(\frac{mL}{L} \right) = -5.98 \times 10^4 + 1.84 \times 10^4 X_1 + 9.10 X_2 - 1377.25 X_1^2 + 2.13 X_1 X_2 - 0.05 X_2^2 \quad (5.2)$$

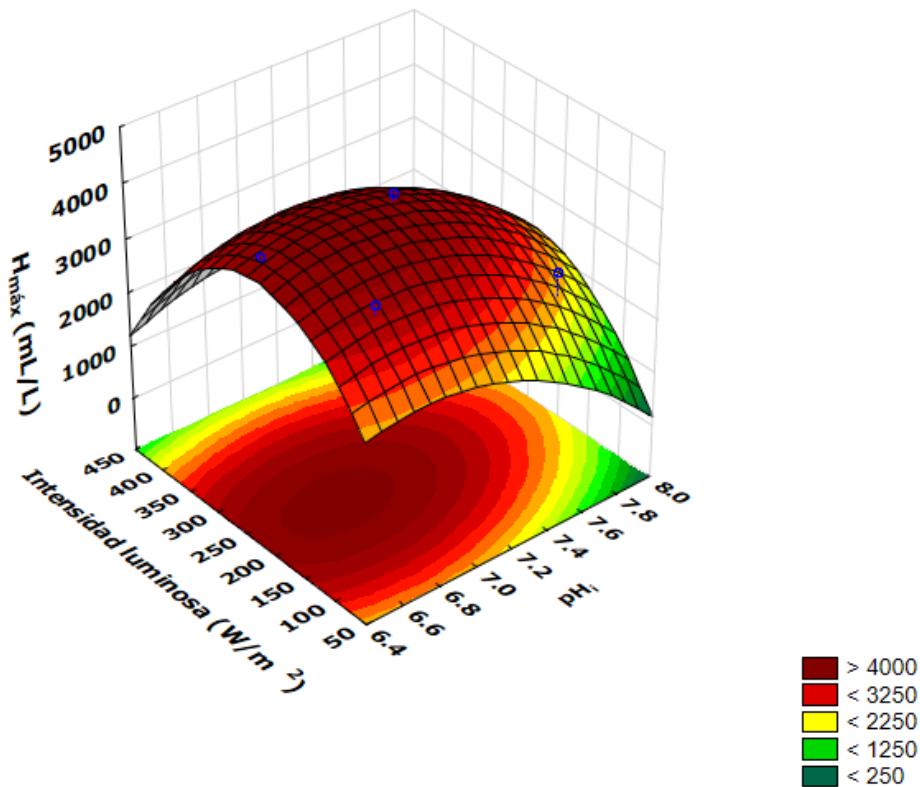


Figura 5.4. Superficie de respuesta para H_{máx} en función del pH_i y la intensidad luminosa

La determinación del coeficiente (R^2) fue 0.89 y el valor de R^2 ajustado fue 0.76. El gráfico de superficie de respuesta para $H_{m\acute{a}x}$ como una función del pH_i y la intensidad luminosa (Figura 5.4) muestra que aunque es posible obtener altas producciones de hidrógeno con distintas combinaciones de pH_i e intensidad luminosa, cuando la intensidad luminosa superó los 400 W/m^2 se observó una disminución significativa de $H_{m\acute{a}x}$. Asimismo, la combinación de pH superiores a 7.2 y bajas intensidades luminosas (menores a 100 W/m^2), también decrecen el valor de $H_{m\acute{a}x}$. El análisis estadístico predice que el máximo volumen acumulado de H_2 ($H_{m\acute{a}x} = 4122 \text{ mL/L}$) puede obtenerse con un pH_i de 6.8 y una intensidad luminosa de 231 W/m^2 .

Con respecto a la velocidad máxima de producción de H_2 ($R_{m\acute{a}x}$), el ANOVA (Anexo A.2) mostró que los términos X_1 , X_2 y X_1^2 tienen un efecto significativo ($p = 0.0329$, 0.0285 y 0.0012) sobre la variable de respuesta. Los valores de R^2 y R^2 ajustado para el polinomio de segundo grado (5.3) fueron 0.96 y 0.90 , respectivamente.

$$R_{m\acute{a}x}\left(\frac{mL}{L\ h}\right) = 1185.59 - 322.59X_1 - 0.09X_2 + 22.07X_1^2 + 5.80 \times 10^{-3}X_1X_2 + 1.23 \times 10^{-4}X_2^2 \quad (5.3)$$

La superficie de respuesta para $R_{m\acute{a}x}$ (Figura 5.5) no muestra un máximo, pero si predice que a un pH_i de 7.3 y una intensidad luminosa de 186.2 W/m^2 se obtendría la mínima velocidad de producción de H_2 ($R_{m\acute{a}x} = 2.8 \text{ mL/L/h}$). En el gráfico se puede observar que cuando el pH_i es menor a 6.6 se pueden obtener valores altos de $R_{m\acute{a}x}$, sin que ésta se afecte significativamente por la variación en la intensidad luminosa. Sin embargo, a medida que el pH incrementa, la velocidad de producción de hidrógeno si se ve influenciada por la intensidad luminosa.

En el gráfico también se observa que se pueden obtener altos valores de $R_{m\acute{a}x}$ con $pH_i > 7.6$ en combinación con intensidades superiores a 350 W/m^2 . Sin

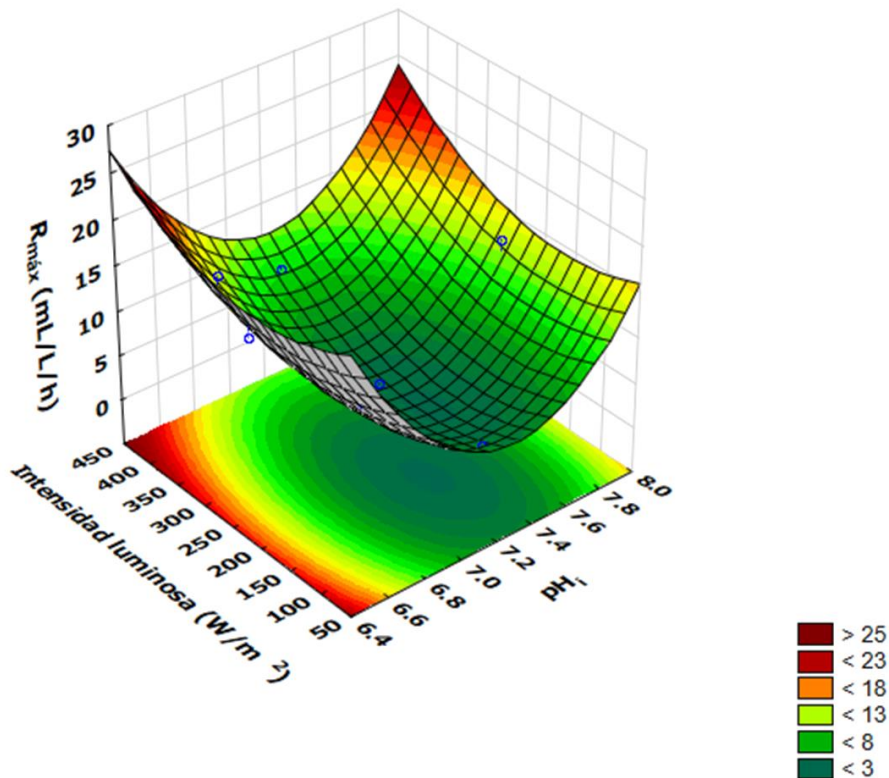


Figura 5.5. Superficie de respuesta para $R_{m\acute{a}x}$ en funci3n de pH_i y la intensidad luminosa

embargo; al comparar con el gráfico de la Figura 5.4, se observa que en estas condiciones el valor $H_{m\acute{a}x}$ disminuye. Las diferencias en los comportamientos de ambas gráficas pueden deberse a los cambios de pH que suelen presentarse a través del cultivo (Match and Das, 2009; Zagrodnik and Laniecki, 2015). En un estudio donde usaron un pH_i de 6.8 se observ3 que el pH increment3 en las primeras horas de cultivo debido al crecimiento microbiano y el consumo de AGV's y que la producci3n de H₂ inici3 con un pH alrededor de 7.5 (Akroum-Amrouche et al., 2011). Se ha observado que una vez que la producci3n de H₂ inicia, el pH suele disminuir (Zagrodnik and Laniecki, 2015). Sin embargo, si el pH incrementa demasiado, la actividad de la nitrogenasa puede afectarse, mientras que la de la hidrogenasa (consumo de H₂) se favorece (Vignais et al., 1985). Dentro del intervalo de condiciones probadas, el pH_i máximo fue 7.9. Este valor de pH puede ser adecuado para iniciar con una velocidad elevada; no obstante, como se observa en la Tabla

5.2, con un $pH_i \geq 7.5$, el pH final fue mayor a 8, lo que pudo disminuir la producción de H_2 , alcanzando bajos valores de $H_{m\acute{a}x}$. Cuando se produce H_2 , simultáneamente se forma CO_2 que puede controlar los cambios de pH (Gabrielyan et al., 2015), por lo tanto, los cambios en el pH en las condiciones más favorables para la producción de H_2 fueron mínimas. Tao et al. (2008) observaron que a ciertos valores de pH las bacterias pueden autorregularlo, sin embargo, conforme el pH inicial fue mayor, las bacterias perdieron esta capacidad.

Por otro lado, el efecto de la intensidad luminosa sobre la producción de hidrógeno ha sido relacionado previamente con la síntesis de los pigmentos fotosintéticos (bacterioclorofilas y carotenoides), enzima nitrogenasa y ATP (Carlozzi and Sacchi, 2001; Akroum-Amrouche et al., 2011). También se ha observado que las bacterias creciendo a bajas intensidades luminosas producen H_2 durante la fase de crecimiento y la producción decrece cuando el crecimiento para. En contraste, si la intensidad de luz incrementa, los microorganismos pueden mantener su máxima velocidad de producción o incluso incrementarla durante la fase estacionaria del crecimiento microbiano (Akroum-Amrouche et al., 2011), esto se relaciona con un incremento en la síntesis de la nitrogenasa (Meyer et al., 1978). Sin embargo, cuando la intensidad luminosa sobrepasa un umbral (saturación) la producción puede disminuir debido a un suministro excesivo de ATP y Fd_{red} por parte del sistema fotosintético, en comparación con la capacidad de la nitrogenasa. El exceso de fotones se disipa como calor, conduciendo a daño celular (Akroum-Amrouche et al., 2011). En el caso específico de sistemas con biomasa inmovilizada, se ha observado que las condiciones de iluminación también afectan las características de la biopelícula, afectando también la transferencia de masa en la misma. Liao et al. (2010), observaron que, a intensidades luminosas por encima del valor de saturación, se presentó un incremento en la formación de sustancias poliméricas extracelulares, lo que llevó a una disminución en la porosidad de la biopelícula. Los altos valores de $R_{m\acute{a}x}$ observados a intensidades superiores a $350 W/m^2$ pudieron deberse a que en un principio esta intensidad favoreció la rápida

síntesis de la enzima, sin embargo, a medida que el cultivo avanzó se presentó saturación, conduciendo a valores bajos de $H_{m\acute{a}x}$ en estas condiciones.

Lograr altas producciones de hidrógeno (altos valores de $H_{m\acute{a}x}$) en el menor tiempo posible (altos valores de $R_{m\acute{a}x}$) representa una ventaja desde el punto de vista económico del proceso. Analizando la Figura 5.4 y la Figura 5.5, se puede concluir que un pH_i menor a 6.6 y una intensidad luminosa 150 y 300 W/m^2 , puede permitir altos valores en ambas variables.

Finalmente, el ANOVA (Anexo A.2) demostró que para la remoción de DQO (ΔDQO , %) los términos significativos del modelo son X_1 , X_1^2 y X_2^2 ($p = 0.0055$, 0.0305 y 0.0375 , respectivamente). La ecuación polinomial (5.4) mostró un R^2 de 0.92 y R^2 ajustado de 0.82 .

$$\begin{aligned} \Delta DQO (\%) = & -895.40 + 289.06X_1 - 0.02X_2 - 21.45X_1^2 + 0.03X_1X_2 \\ & - 3.44 \times 10^{-4}X_2^2 \end{aligned} \quad (5.4)$$

El efecto del pH sobre la remoción de materia orgánica (ΔDQO) está relacionado con la actividad enzimática y las rutas metabólicas de las bacterias, debido a que éste determina la forma iónica de los sitios activos de las enzimas (Laocharoen and Reungsang, 2014; Lazaro et al., 2015). Estudios previos han mostrado que la velocidad máxima de crecimiento ocurre a valores de pH entre 6 y 7, intervalo en el que también se favorecen la producción de H_2 (Sasikala et al., 1995; Nath and Das, 2009). Ambos procesos conllevan el consumo de sustrato. Sin embargo, aun en condiciones de pH_i e intensidad luminosa a las que no se favoreció la producción de H_2 , la ΔDQO fue mayor a 75%. Lo anterior se debe a que las bacterias PNS poseen diversas rutas metabólicas (Pechter et al., 2016) y el consumo de compuestos carbonados no necesariamente se relaciona con la producción de H_2 (Lu et al., 2011). La remoción de DQO en condiciones no favorables para la producción de H_2 puede relacionarse con otras rutas metabólicas.

Una de las rutas que suele competir con la producción de H_2 es la formación de polihidroxibutirato (PHB), debido a que al igual que la producción de H_2 permite disipar el exceso de electrones y poder reductor (Koku et al., 2002) y también se ve favorecida a altas relaciones C/N (Yiğit et al., 1999). Sustratos como acetato, propionato y butirato suelen ser favorables para la producción de PHB (Hustede et al., 1993; Cardeña et al., 2017) debido a que éstos pueden ser convertidos a Acetil-CoA, intermediario en la síntesis de este polímero (Wu et al., 2012). Se ha observado que mientras la producción de H_2 puede detenerse o disminuir en sistemas sin control de pH cuando el pH incrementa, la acumulación de PHB puede incrementar (Hustede et al., 1993; Kim et al., 2011). Por otro lado, se ha reportado que el contenido de PHB no se ve afectado por las variaciones en la intensidad luminosa (Lee et al., 2002).

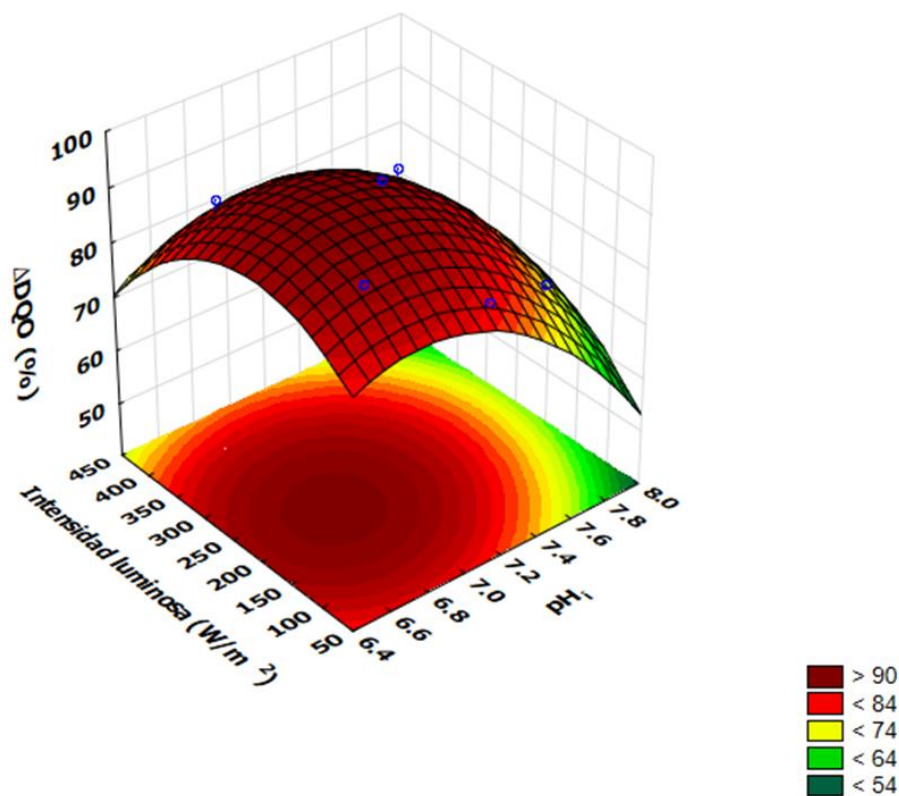


Figura 5.6. Gráfico de superficie de respuesta para ΔDQO en función del pH_i y la intensidad luminosa

El análisis de superficie de respuesta (Figura 5.6) mostró una máxima remoción de DQO de 95.4% con un pH_i de 6.9 y una intensidad luminosa de 224 W/m^2 .

Además de la optimización de $H_{\text{máx}}$, $R_{\text{máx}}$ y ΔDQO de forma individual, se realizó un análisis para la optimización de múltiples respuestas, con la finalidad de encontrar la combinación de pH_i e intensidad luminosa que permitiera obtener los valores más altos de las tres variables en forma simultánea, usando el software Statgraphics Centurion v15.1.0.2 © StatPoint, Inc. Mediante el uso del modelo se determinó que para maximizar simultáneamente las tres variables de respuesta ($H_{\text{máx}} = 3990 \text{ mL}/\text{L}$, $R_{\text{máx}} = 15.2 \text{ mL}/\text{L}/\text{h}$ y $\Delta\text{DQO} = 92.9\%$), se requiere un pH_i de 6.5 y una intensidad luminosa de 221 W/m^2 .

Cabe destacar que el pH_i óptimo que predice el modelo es un poco más bajo al reportado como óptimo para la nitrogenasa (Koku et al., 2002). Distintos autores han reportado como óptimos para la producción de H_2 , valores de pH cercanos a 7 o un poco más altos (Fang et al., 2005; Lazaro et al., 2015; Zagrodnik and Laniecki, 2015). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, durante los experimentos el pH incrementó debido al crecimiento y el consumo de AGV's. El pH final en los experimentos que iniciaron con un $\text{pH} < 7.2$, se mantuvo alrededor de 7.5 (Tabla 5.2), mostrando que el proceso se desarrolló alrededor de un pH neutro. Por otro lado, cuando el pH_i fue 7.2 o más alto, el pH final fue hasta de 9.5, afectando tanto la producción de H_2 como la remoción de DQO.

En lo que respecta a la intensidad luminosa, existen diferentes estudios que indican que valores alrededor de 200 W/m^2 son apropiados para la producción de H_2 (Uyar et al., 2007; Argun and Kargi, 2010b; Lazaro et al., 2015). El valor que predice el modelo concuerda con los valores documentados en la bibliografía. El estudio de Jamil et al. (2009) para la optimización de la producción de H_2 y el consumo de DQO con MSR mostró un valor óptimo de 267 W/m^2 , un poco mayor al

encontrado en este estudio. El hecho de trabajar con biomasa suspendida y un sustrato complejo (efluente de fermentación oscura) con una DQO más alta, puede incrementar los requerimientos de energía luminosa. Se ha observado que los efluentes de fermentación oscura pueden presentar cierta coloración o turbidez que afecta la penetración de la luz, requiriendo de pretratamientos o dilución para mejorar la producción de hidrógeno (Eroğlu et al., 2006; Özgür and Peksel, 2013) En el estudio de Jamil et al. (2009) el medio fue previamente centrifugado y filtrado para disminuir turbidez y mejorar la iluminación.

Por último, se realizaron fotofermentaciones a las condiciones de pH_i e intensidad luminosa que el modelo predijo como óptimas. La verificación experimental arrojó valores de $H_{\text{máx}} = 4142 \pm 201$ mL/L, $R_{\text{máx}} = 14.5$ mL/L/h y $\Delta\text{DQO} = 93.4 \pm 3.2$ %. Las diferencias con los valores estimados por el sistema fueron de 3.8, 4.6 y 0.5%, respectivamente. Aun cuando algunos autores han reportado valores más altos para $R_{\text{máx}}$, es importante señalar que la principal contribución en este estudio es el uso de un consorcio inmovilizado, cuyos resultados pueden usarse como referencia para distintas especies de bacterias PNS. Además, el uso del consorcio no requirió de esterilización y la inmovilización permite una fácil recuperación y reúso de la biomasa, con un soporte de bajo costo.

5.4 Conclusiones

Se observó que, la fuente de iluminación, el pH inicial y la intensidad luminosa tienen una influencia significativa sobre la producción de H_2 y remoción de DQO. Se constató que una longitud de onda única (590 nm) no es suficiente para favorecer la producción con el consorcio microbiano. Las lámparas de tungsteno permitieron incrementar la producción de H_2 debido a su espectro continuo que cubre completamente el espectro de absorción de los pigmentos fotosintéticos de las bacterias PNS. La optimización del pH inicial y la intensidad luminosa con las lámparas de tungsteno demostró que es posible conseguir una $H_{\text{máx}} = 3990$ mL/L,

$R_{\text{máx}} = 15.2 \text{ mL/L/h}$ y una $\Delta\text{DQO} = 92.9 \%$, cuando el pH_i es 6.5 y la intensidad 221 W/m^2 . La verificación experimental de la máxima producción de H_2 , velocidad de producción de H_2 y remoción de DQO a las condiciones óptimas determinadas por superficie de respuesta, mostró errores menores al 5% para las tres variables, demostrando la confiabilidad del modelo de regresión.

Capítulo 6. Efecto del tiempo de retención hidráulica sobre la producción continua de hidrógeno en un fotobiorreactor con biomasa inmovilizada

Resumen

En los procesos en continuo, el tiempo de retención hidráulica (TRH) es uno de los factores de mayor influencia en la producción de H_2 y el consumo de sustrato. Para el caso de la fotofermentación, TRH cortos suelen causar lavado celular debido a la baja velocidad de crecimiento de las bacterias y su pobre floculación. Los sistemas con biomasa inmovilizada pueden evitar dichos problemas. En el presente estudio se evalúa la producción de H_2 y el consumo de sustrato con un consorcio microbiano inmovilizado sobre fibras de luffa en un reactor tubular usando como sustrato acetato, butirato y propionato a dos distintas concentraciones de influente. Se probaron TRH entre 24 y 96 h. Se determinaron los cambios en el consorcio microbiano con técnicas de biología molecular. Se observó que un TRH de 48 h permitió alcanzar producciones de 330 mL H_2 /Ldía y una remoción de DQO del 45%, con una DQO del influente de 6600 mg/L. La identificación molecular indica que la producción de H_2 se debe principalmente a la presencia de *Rhodopseudomonas palustris* y especies del género *Rhodobacter*. El uso de biomasa inmovilizada permitió operar con TRH cortos sin lavado de biomasa. Los tiempos de retención largos pueden favorecer la producción de metano y el desarrollo de microorganismos que consumen el sustrato sin producción de H_2 . La presencia de arqueas hidrogenotróficas indica que, además de operar a TRH cortos, se debe mantener una baja presión parcial de H_2 en el sistema.

Artículos derivados de este capítulo:

Guevara-López, E., Monroy I., Buitrón G. Indoor and outdoor continuous hydrogen production by photofermentation: Effect of the HRT on the consortium microbial diversity and a process model (*En preparación*).

6.1 Introducción

La mayoría de los estudios de producción de H₂ por fotofermentación han sido realizados en sistemas en lote. Sin embargo, la producción en continuo ofrece diversas ventajas para aplicaciones prácticas y económicamente viables. En los procesos en continuo, el tiempo de retención hidráulica (TRH) es uno de los factores que más impactan en la producción de H₂, estabilidad del proceso y consumo de sustrato (Xie et al., 2015; Zhang et al., 2015). En el caso particular de las bacterias púrpura fototróficas (purple non-sulfur, PNS), la producción en continuo presenta distintos inconvenientes, como son el lavado de biomasa debido a su limitada floculación, lo que propicia un rápido decrecimiento en la concentración celular del sistema (Keskin et al., 2012). Como consecuencia, gran parte del sustrato suministrado es usado para crecimiento celular, a fin de mantener constante la concentración de biomasa y lograr el estado estacionario, lo que disminuye la producción de H₂ (Xie et al., 2014). La presencia de biomasa en el efluente también genera turbidez e incrementa los contaminantes en el mismo (Xie et al., 2015). Por lo anterior, los TRH utilizados en fotofermentación suelen ser largos (Chen et al., 2008b; Ozmihci and Kargi, 2010; Xie et al., 2015). La inmovilización celular representa una opción, al proteger el sistema contra el lavado celular (Keskin et al., 2012). Además, se ha observado que los sistemas con fotobacterias inmovilizadas pueden proteger contra factores inhibitorios y permiten trabajar con altas concentraciones celulares sin obstrucción al paso de luz (Guo et al., 2011). A pesar de las ventajas de estos sistemas, aún existen pocos estudios con biomasa inmovilizada y en general, la mayor parte se han realizado con especies puras, lo que también puede ser impráctico para el desarrollo del proceso.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del tiempo de retención hidráulica (TRH) en la producción de H₂, consumo de sustrato y la comunidad microbiana en la fotofermentación en continuo con un consorcio microbiano inmovilizado sobre fibras de luffa.

6.2 Estrategia experimental

6.2.1 Inóculo y condiciones de cultivo

Se partió del mismo inóculo descrito en las secciones 4.2.1 y 4.3.5, el cual se cultivó en medio de crecimiento (Sección 3.3.1). Las condiciones de cultivo y recuperación de la biomasa también fueron descritas previamente (Sección 3.2). El procedimiento de inmovilización se describió en la Sección 5.2.2.

6.2.2 Fotobiorreactor y modo de operación

Los experimentos se llevaron a cabo en un reactor tubular de vidrio Pyrex de 2.54 cm de diámetro, con un volumen de trabajo de 260 mL (área irradiada $\approx 285 \text{ cm}^2$) (Figura 6.1). El biorreactor fue inoculado con el consorcio microbiano inmovilizado en las fibras de luffa (160 mg de SV sobre 4 g de luffa seca, 600 mg SV/L de reactor). La operación del reactor inició en modo lote con medio de crecimiento (Sección 3.3.1) e iluminación continua. Cuando la producción rebasó los 200 mL/L/día, se inició la operación en continuo con ciclos luz/oscuridad 12 h/12 h. Como alimentación, se usó el medio de producción de H_2 que se describe en la Sección 3.3.2, con TRH de 48, 60 y 96 h. Adicionalmente, se usó el medio de producción de H_2 en dilución 1:2 con TRH de 24, 36 y 48 h. Las concentraciones de la fuente de carbono (acetato, propionato y butirato) y la fuente de nitrógeno (glutamato) de los medios usados se muestran en la Tabla 6.1. La iluminación se llevó a cabo con 6 focos de tungsteno (3 a cada lado del reactor) ajustando la intensidad luminosa a 221 W/m^2 a través de un atenuador (dímer). El pH del influente fue de 6.5 (condiciones optimizadas en el Capítulo 5). La temperatura del reactor se mantuvo en $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Durante cada cambio de TRH el reactor fue inoculado con soporte nuevo (conteniendo las células inmovilizadas) a fin de asegurar la viabilidad del cultivo y partir del mismo inóculo inicial.

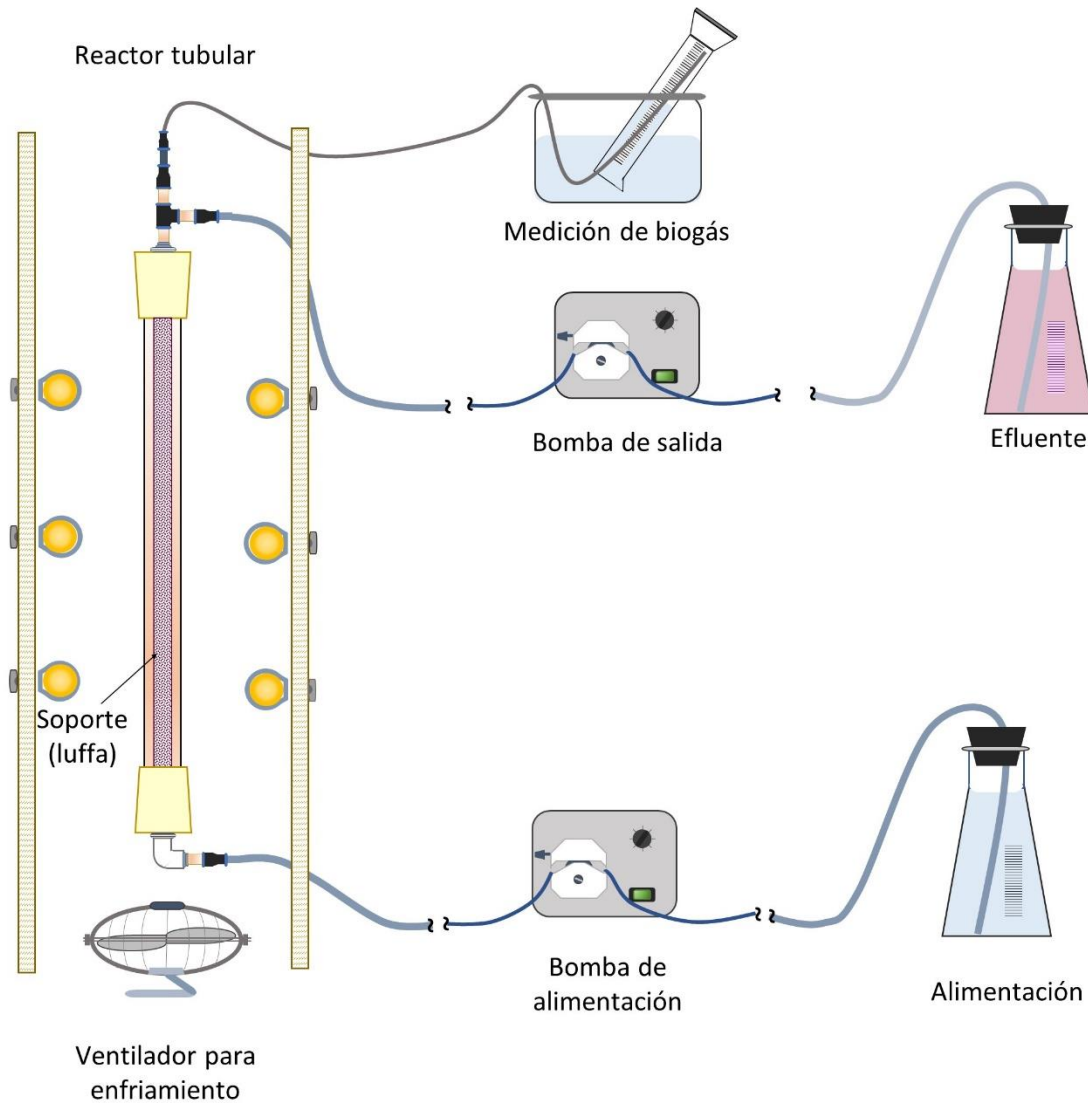


Figura 6.1. Esquema del sistema utilizado para la producción de H_2 por fotofermentación

Durante los experimentos se evaluaron los SSV (Sección 3.4.2), AGV's (Sección 3.5.1), pH (Sección 3.8), producción y composición del biogás (Sección 3.7), DQO (Sección 3.5.2) y concentración inicial y final de SV en el soporte (Sección 3.4.3). Los resultados de la producción de H_2 se presentan en condiciones estándar de presión y temperatura.

Tabla 6.1. Tiempos de retención hidráulica (TRH), concentración de AGV's y carga orgánica (CO) evaluados en el fotobiorreactor

Corrida	DQO _{in} (mg/L)	TRH (h)	Concentración de AGV's en el influyente			Glutamato	CO gDQO/Ldía
			Acético	Propiónico	Butírico		
a		48					3.30
b	6600	60	1200	715	1571	1511	2.65
c		96					1.65
d		24					3.30
e	3300	36	600	358	786	756	2.20
f		48					1.65

6.2.3 Identificación molecular de las especies microbianas del consorcio a distintos TRH

Para observar los cambios en la comunidad microbiana de acuerdo con las condiciones de operación del reactor, se recolectó la biomasa generada a partir de un tiempo igual a 3TRH contados desde el inicio de la operación en continuo y ésta se concentró por centrifugación. Se realizó la extracción de ADN y el análisis por pirosecuenciación acorde a la metodología descrita anteriormente (Secciones 3.9.1 y 3.9.2) para la determinación de arqueas y bacterias. Para la secuenciación de los amplicones se usó la plataforma MiSeq (Illumina, Inc., U.S.A.). Los cebadores (primers) usados para bacterias fueron 28F y 388R y para arqueas 517F y 909R. Se generaron entre 18,055 y 25,208 secuencias por muestra para bacterias y entre 9,180 y 18,237 secuencias para arqueas.

6.3 Resultados

6.3.1 Efecto del TRH sobre la producción de hidrógeno

En la Figura 6.2a, b y c se muestra la producción de H₂ diaria (mL/Ldía) con TRH de 48, 60 y 96 h, respectivamente. Las líneas grises verticales en las gráficas muestran el cambio de la operación en lote a continuo. En la Figura 6.2c se observa

que, aunque inicialmente se alcanza una velocidad de producción alta (R_{H_2}) (450 mL/Ldía) con un TRH de 96 h, tras 100 h de operación del reactor, se observó una caída en la producción y posteriormente, la aparición de metano. Aunque en fotofermentación se han reportado TRH de 96 h o mayores como óptimos para la producción de H_2 (Argun and Kargi, 2010a), cabe destacar que estos estudios han sido realizados con cultivos puros y en condiciones estériles. En el presente estudio, se usó un consorcio microbiano. Aunque no se detectaron arqueas en el inóculo inicial, éstas pudieron estar presentes desde el inicio de la operación en baja proporción como para ser detectadas, o bien, debido a que no se manejaron condiciones estériles en el proceso, provenir de alguna otra fuente que entró en contacto con el medio. Los tiempos de retención largos, suelen ser favorables para estas especies debido a sus bajas velocidades de crecimiento (Won and Lau, 2011).

Con un TRH de 60 h (Figura 6.2b), se observó un comportamiento similar, inicialmente la producción superó los 300 mL/Ldía, pero después de 200 h de operación, ésta también decayó. Sin embargo, a diferencia del TRH de 96 h, no se detectó producción de metano durante la operación a éste TRH. La disminución en la producción de hidrógeno a TRH largos ha sido asociada por otros autores a otros fenómenos, como la acumulación de compuestos inhibitorios, entre estos el amonio (Chen et al., 2008b). Para el TRH de 48 h ($CO = 3.30$ g DQO/Ldía, Figura 6.2a), se logró un R_{H_2} de 330 mL/Ldía, sin presentarse disminución en la producción o aparición de metano al final de la operación.

En las corridas mostradas en la Figura 6.2d, e y f se observa que al reducir la DQO del influente a la mitad, se logró obtener una producción más estable de H_2 . En ninguno de los tres TRH probados (24, 36 y 48 h) se observó una disminución en la producción de H_2 o producción de metano. No obstante, las velocidades de producción de H_2 fueron bajas (240, 240 y 170 mL/L/día, para 24, 36 y 48 h, respectivamente) comparando con las alcanzadas en la corrida a). También se observó que, aunque la producción de H_2 con los TRH de 24 y 36 h fue la misma,

la carga orgánica (CO) con el TRH de 36 h es menor, es decir, se logra la misma producción con una menor cantidad de sustrato.

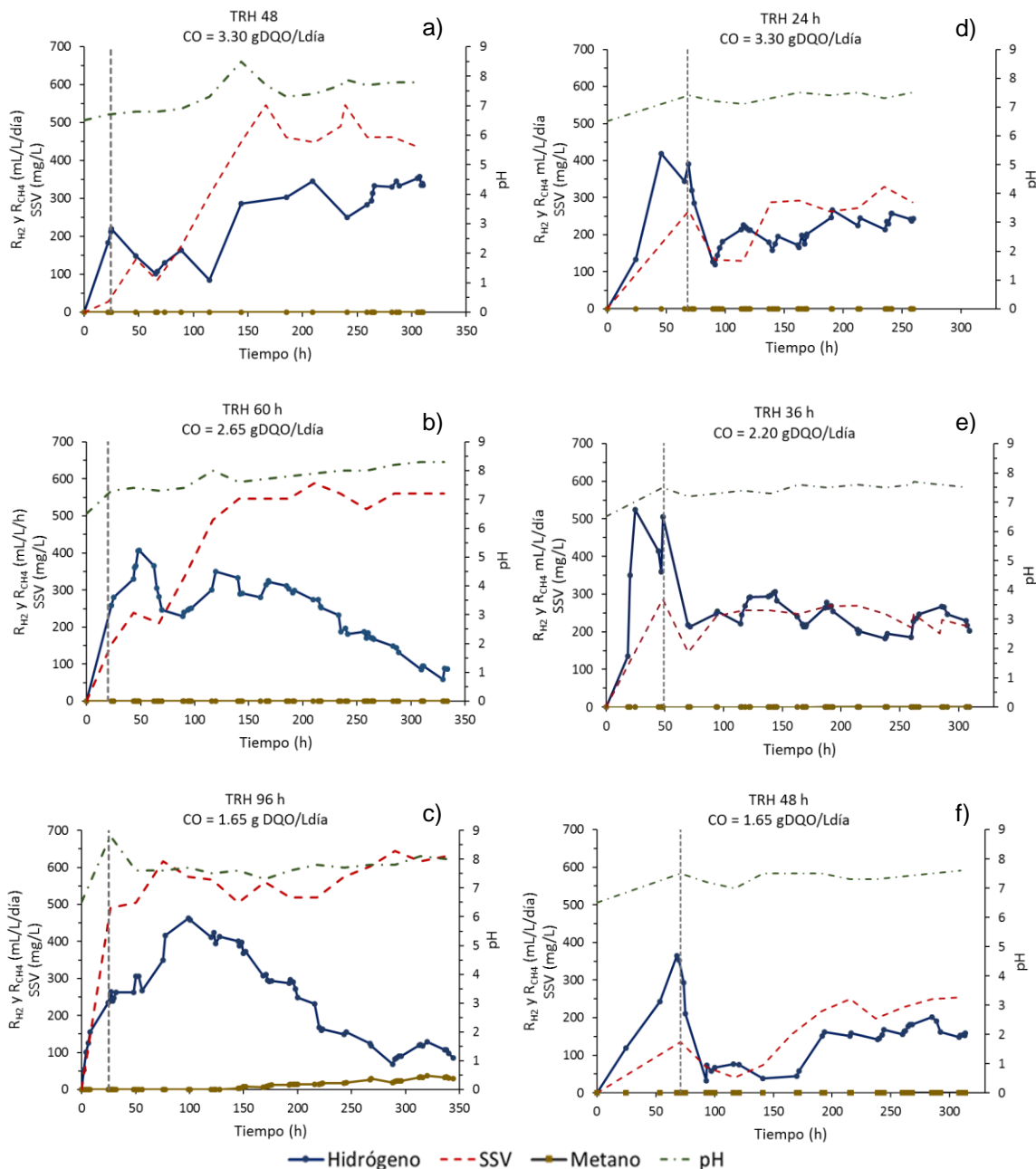


Figura 6.2. Velocidad de producción de H_2 (R_{H_2}), pH y SSV durante la operación en continuo del reactor con las condiciones descritas en la Tabla 6.1

En las gráficas también se observa el cambio en el pH y los SSV durante el tiempo de proceso. Debido a que el reactor no contó con control de pH, se observó un incremento de este con el tiempo, lo que se asocia generalmente al consumo de AGV's (Gabrielyan et al., 2010). El pH final para las condiciones evaluadas alcanzó valores alrededor de 8. El cambio en éste afecta la forma iónica del sitio activo de la nitrogenasa y, por tanto, la conversión de sustrato a H₂ (Wang et al., 2010b). Por otro lado, un pH alcalino en el sistema puede resultar favorable para la actividad de la hidrogenasa (Akroum-Amrouche et al., 2011), lo que puede conducir al consumo del H₂ que se está produciendo. El control de pH en el sistema podría incrementar el rendimiento del sistema.

En cuanto a los SSV, la concentración alcanzada fue mayor con el TRH de 48 h, en comparación al de 60 y 96 h cuando la DQO del influente fue de 6600 mg/L (Figura 6.2a, b y c). Sin embargo, cabe destacar que la mayor parte de la biomasa encargada de la producción de H₂ en este estudio se encuentra adherida al soporte. Las cantidades finales de SV (mg) sobre las fibras de luffa fueron 320 mg (1230 mg/L), 420 mg (1620 mg/L) y 390 mg (1500 mg/L) para los TRH de 48, 60 y 96 h (corridas a, b y c), respectivamente. En el caso de los experimentos con el influente con DQO de 3300 mg/L, se alcanzaron concentraciones de SSV de 290, 220 y 230 mg/L (Figura 6.2d, e y f) para 24, 36 y 48 h. Las concentraciones finales de SV en el soporte fueron 310 mg (1200 mg/L), 300 mg (1150 mg/L) y 290 mg (1120 mg/L). Esto muestra que en las condiciones donde se logró una producción estable de H₂, la concentración de SV se mantuvo cercana a 1.5 g/L (biomasa suspendida más fija), mientras que los TRH de 60 y 96 h, que no fueron favorables para la producción de H₂, la concentración de SV fue mayor (cercana a 2 g/L).

Aun cuando el reactor operó con TRH cortos, fue posible alcanzar una concentración celular alta (\approx 1.5 g/L de SV) debido a la inmovilización, evitando el lavado celular que suele ser un inconveniente en estos sistemas (Xie et al., 2015). Por otro lado, la inmovilización también evitó la obstrucción al paso de luz como

resultado del incremento en la biomasa y la concentración de pigmentos fotosintéticos en el cultivo.

Tabla 6.2. Comparación de la producción de H₂ con otros estudios en continuo

Cepa	Sustrato	DQO _{in} (g/L)	TRH (h)	R _{H₂} (mL/Lh _{luz})	Y _{H₂} (%)	Referencia
<i>R. palustris</i> (inmovilizada)	Glucosa	10.5	48	35	11.7 ^a	(Liu et al., 2016)
<i>R. faecalis</i> (bioagregados)	Acetato	3.85	96	44	83.8 ^a	(Xie et al., 2015)
<i>R. capsulatus</i>	Acetato	3.1	240	15	69 ^c	(Androga et al., 2011a)
<i>R. faecalis</i>	Acetato	2.40	60	19	47.3 ^a	(Xie et al., 2014)
<i>R. palustris</i> (inmovilizada)	Acetato	1.00	36	44	90 ^c	(Chen and Chang, 2006)
Consorcio inmovilizado	Acetato, propionato y butirato	6.60	48	28	9 ^a	Este estudio
		3.30	36	20	10 ^a	

^aCalculado con respecto al sustrato alimentado

^cCalculado con respecto al sustrato consumido

En la Tabla 6.2, se comparan los resultados de este estudio con otros reportados en la literatura, considerando solamente las horas de iluminación. Se puede observar que las velocidades están en el rango de las reportadas en otros estudios. Cabe señalar que, si bien los estudios de Liu et al. (2016) y Chen and Chang (2006) reportan velocidades altas con TRH cortos, estos utilizaron combinación de iluminación externa e interna (a través de fibras ópticas).

Pocos trabajos con biomasa inmovilizada reportan la velocidad de producción de H₂ por área superficial del soporte. En este estudio se obtuvo una velocidad máxima de 60 mL/m²h_{luz} a un TRH de 48 h y DQO_{in} = 6600 mg/L (Tabla 6.3). Velocidades similares fueron reportadas para *R. palustris* inmovilizada en láminas de látex, 46.6 mL/m²h (Gosse et al., 2010) y *R. palustris* en la pared estriada de un reactor de acrílico, 85.5 mL/m²h (Zhang et al., 2010). Otros estudios han reportado velocidades mucho mayores. Para *R. rubrum* inmovilizada en agar se alcanzó una velocidad de 270 mL/m²h (Planchard et al., 1989), sin embargo, la

velocidad volumétrica fue de sólo 1.35 mL/Lh. Los resultados dependen de los materiales utilizados para la inmovilización y su relación A/V.

En cuanto a la eficiencia fotoquímica (LCE), en la Tabla 6.3 se observa que la máxima se encontró alrededor del 0.3%. Aunque el valor es bajo, en general, las eficiencias fotoquímicas para las bacterias PNS suele estar en este rango (Shi and Yu, 2005; Uyar et al., 2007; Zhang et al., 2010). Se estima que el máximo teórico para fotofermentación es alrededor del 10% (Akkerman et al., 2002), y aunque otros autores han reportado valores más altos (Tian et al., 2010; Wang et al., 2013), estos resultados pueden estar asociados a consideraciones erróneas en el cálculo.

Tabla 6.3. Resultados de la producción de H₂ y eficiencias de conversión para las condiciones evaluadas (Tabla 6.1)

Corrida	mL H ₂ /Lh _{luz}	mLH ₂ /m ² h _{luz}	Y _{H₂} ^a (%)	Y _{H₂} ^c (%)	LCE (%)	ΔDQO (%)
a	28	60	9.0	22.1	0.3	45
b	-	-	-	-	-	60
c	-	-	-	-	-	70
d	20	44	6.6	16.2	0.2	41
e	20	44	9.9	23.9	0.2	51
f	14	31	9.3	12.4	0.2	61

Y_{H₂}^a, conversión del sustrato considerando el sustrato alimentado.

Y_{H₂}^c, conversión del sustrato considerando el sustrato consumido.

LCE, eficiencia fotoquímica (eficiencia de conversión de luz), ecuación (1.15).

6.3.2 Efecto del TRH sobre el consumo de sustrato

En la Figura 6.3 se muestran las concentraciones de AGV's y DQO en el efluente. Se observó que para los experimentos con una DQO en el influente de 6600 mg/L y TRH de 96 h, la remoción fue cercana al 70 % (Figura 6.3c). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, esta condición no favoreció la producción de H₂. Se ha reportado que las bacterias PNS consumen el acetato antes que el butirato para la producción de H₂ (Han et al., 2012), sin embargo, para el TRH de 96 h se observó

que el consumo de butirato fue mayor, lo que podría indicar un cambio en el metabolismo que afectó la producción de H₂.

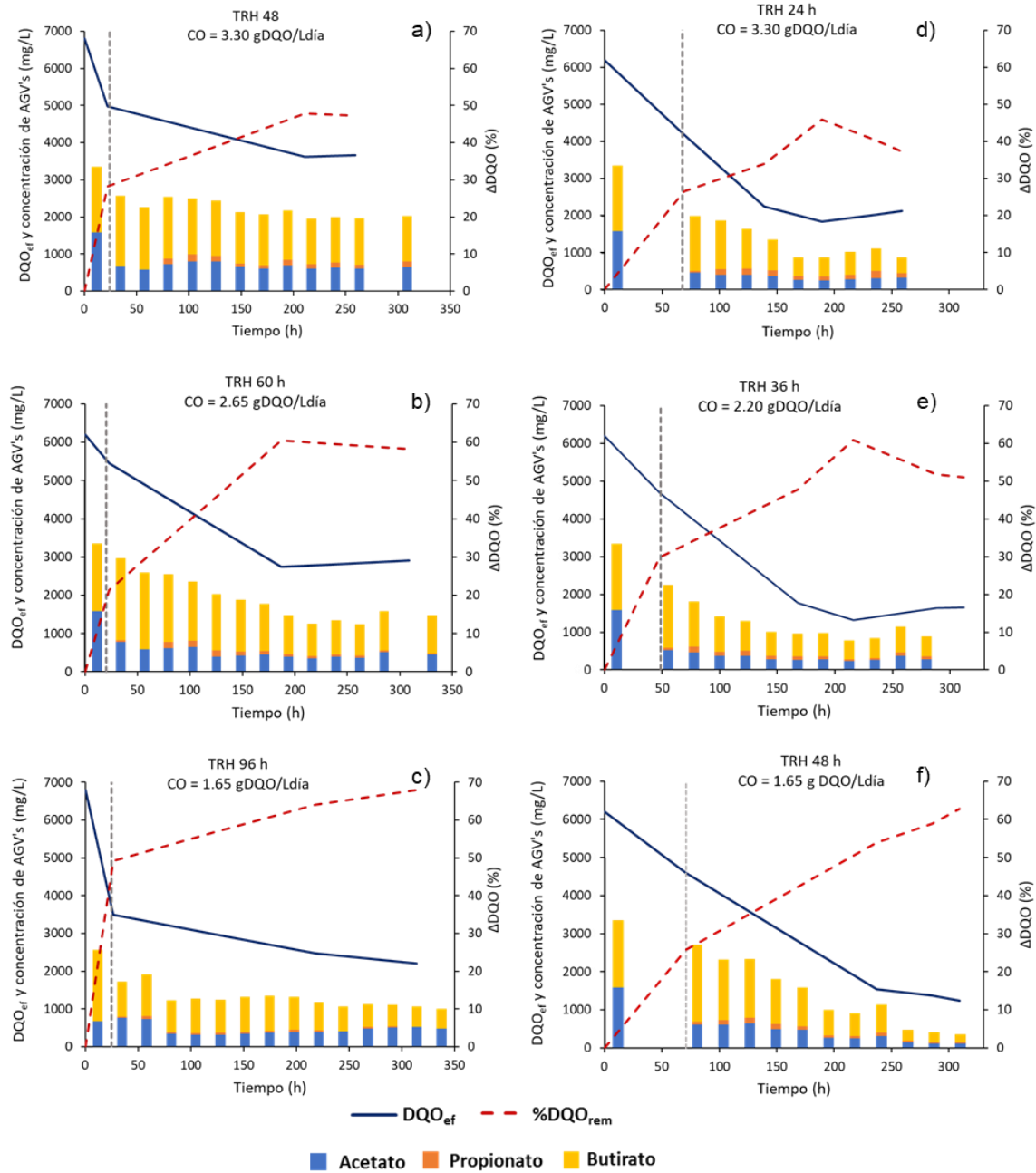


Figura 6.3. Concentración de AGV's y DQO en el efluente durante la operación del reactor con las condiciones descritas en la Tabla 6.1

Cuando el TRH fue de 60 h (Figura 6.3b), la remoción de DQO decreció a 60%, sin embargo, en esta condición se observó un mayor consumo de acetato que

para el TRH de 96 h. Para el caso del TRH de 48 h (Figura 6.3a), la remoción alcanzó sólo el 45%, no obstante, como se observó en la sección anterior, esta condición permitió alcanzar una mejor producción de H₂, mostrando que una mayor cantidad de sustrato fue utilizado para este fin. La conversión de sustrato en esta condición fue del 9% (con respecto al sustrato alimentado, Tabla 6.3) El butirato fue poco consumido en esta condición, de los 1571 mg/L alimentados, solo se consumieron cerca de 300 mg/L, detectando concentraciones en el efluente alrededor de 1250 mg/L.

Debido al bajo consumo de sustrato, se evaluó la reducción de la DQO en el influente, esperando incrementar la remoción de materia orgánica. Se observa que, al disminuir la DQO del influente a la mitad, las remociones de DQO para los TRH de 24, 36 y 48 h (Figura 6.3d, e y f) fueron de 41, 51 y 61%, respectivamente. Aunque la remoción incrementó para un mismo TRH (48 h) con diferente concentración de influente en un 15%, ésta sigue siendo baja. La conversión de sustrato para los TRH de 36 y 48 h con el influente a 3300 mg/L fueron similares al logrado con el TRH de 48 h e influente de 6600 mg/L (9.9 y 9.3%, Tabla 6.3). Los resultados se deben a que como se sabe, la tasa de conversión de sustrato a H₂ en las bacterias PNS es baja (Xie et al., 2015), por lo que generalmente se requieren TRH largos para incrementar la remoción. Además, el crecimiento y la producción de H₂ se detienen en los periodos de oscuridad y sólo una pequeña parte del sustrato es utilizado para mantenimiento en esas condiciones (Eroglu et al., 2010). Se observa también que, aunque con los TRH de 24 y 36 h se consiguió la misma producción de H₂, el incremento en el TRH aumentó la remoción de DQO en 10% y la conversión de sustrato en 3.3% (Tabla 6.3).

Comparando los resultados de conversión de sustrato con otros trabajos, estas fueron más bajas aun con tiempos de retención similares (Chen and Chang, 2006; Liu et al., 2016). La remoción de materia orgánica fue similar a la reportada por otros autores para operación en continuo con TRH cortos. Zhang et al. (2015)

reportaron una remoción del 40% con un TRH de 24 h. En general, se han reportado remociones mayores que las alcanzadas en este estudio, con altos TRH (Xie et al., 2015).

6.3.3 Efecto del TRH sobre la comunidad microbiana

El análisis molecular mostró que el consorcio bacteriano se ve afectado por las condiciones de operación del reactor (Figura 6.4). En el inóculo aislado originalmente, la abundancia de *R. palustris* fue del 72% y se identificaron otras dos especies de bacterias PNS, *R. gelatinosus* (14%) y *R. sphaeroides* (2%). Aunque *R. palustris* siguió prevaleciendo en las corridas 1 y 2 (69 y 50%) ($DQO_{in} = 6600$ mg/L y TRH de 48 y 60 h), otras especies de bacterias PNS aparecieron en el consorcio. *Blastochloris viridis* mostró una abundancia de 21 y 15% en las corridas 1 y 2, respectivamente.

Blastochloris viridis (antes *Rhodopseudomonas viridis*), crece principalmente en fotoheterotrofia y anaerobiosis y es una de las pocas bacterias PNS que contienen bacterioclorofila b, que le confiere la capacidad de absorber luz en el infrarrojo cercano, con un pico de absorción máxima alrededor de los 1020 nm (Lang and Oesterhelt, 1989; Magdaong et al., 2016). Pueden usar diferentes azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes para crecimiento (Hoogewerf et al., 2003), incluyendo acetato, propionato y butirato. Su sistema fotosintético es similar al de *R. rubrum*, con un único complejo antena (Sturgis and Niederman, 2009), lo que lo hace menos eficiente en la captación de la luz (Bullough et al., 2009) y desde el punto de vista cinético, se ha mencionado que el transporte cíclico de electrones ocurre más lento que en otras especies de bacterias PNS, como *R. sphaeroides* y *R. palustris*. Sin embargo, al igual que en las otras especies de bacterias PNS, tiene la capacidad de adaptar y modificar las estructuras de su fotosistema en función de las condiciones ambientales, como la intensidad luminosa (Konorty et al., 2009). La producción de H_2 con esta especie ha sido poco estudiada. Usando lactato como

fuentes de carbono se reportó una baja velocidad de producción de H₂ en comparación con otras especies de bacterias PNS (revisado por Vignais et al., 1985). Debido a que no se tienen más reportes de la producción de H₂ en esta especie, es difícil saber su contribución en la producción en el presente trabajo.

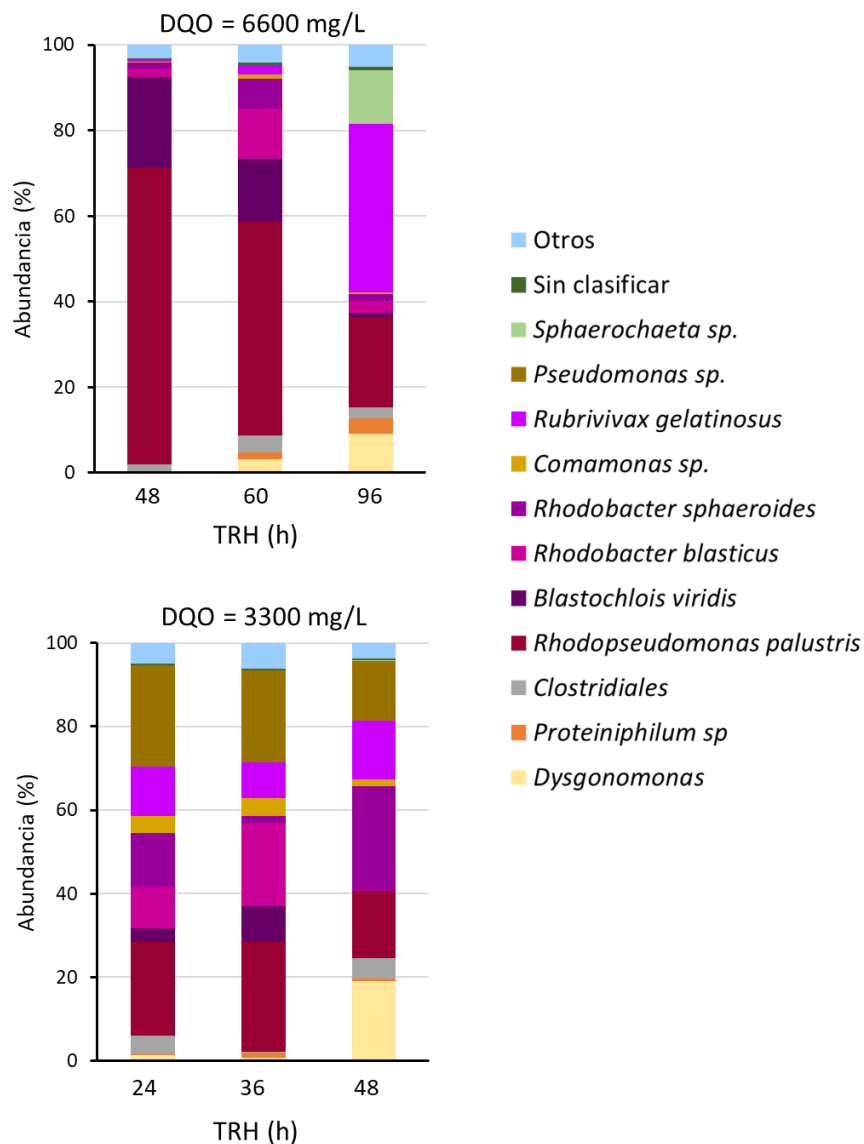


Figura 6.4. Especies bacterianas presentes en el consorcio durante la operación del reactor en las condiciones descritas en la Tabla 6.1

En la corrida 2 (DQO_{in} = 6600 mg/L y TRH 60 h) también se detectó la presencia de *Rhodobacter blasticus* y un incremento de *R. sphaeroides* (12 y 7% de

abundancia, respectivamente). *Rhodobacter blasticus* (antes *Rhodopseudomonas blastica*) no ha sido evaluado de manera individual para la producción de H₂, sin embargo, se sabe que puede utilizar distintas fuentes de carbono para crecimiento bajo metabolismo fotoheterotrófico (glucosa, fructosa, sacarosa, acetato, piruvato, glutamato, malato, butirato, propionato y otros) (Eckersley and Dow, 1980; Nuyanzina-Boldareva et al., 2014) y ha sido evaluada para el tratamiento de aguas residuales con altas remociones de materia orgánica (Wen et al., 2016). Por otro lado, el género *Rhodobacter* ha sido ampliamente usado para la producción de H₂ con distintas fuentes de carbono y se les atribuye altas velocidades y eficiencias de conversión (Fang et al., 2005; Laocharoen and Reungsang, 2014; Elkahlout et al., 2017). *Rhodobacter sphaeroides* es la especie más utilizada para la producción de H₂ (Tao et al., 2008; Li et al., 2009) por fotofermentación.

En la corrida 3 (DQO_{in} = 6600 mg/L y TRH de 96 h), la abundancia de *R. palustris* disminuyó (29%) y la de *R. gelatinosus* incrementó (39%), mientras que el género *Rhodobacter* sólo representó el 5%. Como se mencionó en la Sección 4.3.5, se ha reportado que *R. gelatinosus* no produce H₂ a partir de acetato, propionato y butirato cuando estas son usadas como fuentes de carbono únicas (Wu et al., 2010; Yang et al., 2012), aunque se menciona que es posible que lo hagan cuando estas se encuentran como fuentes de carbono mixtas (Wu et al., 2010; Keskin et al., 2013). Sin embargo, el estudio de Wu et al. (2010), mostró bajos rendimientos de conversión con esta especie, lo que indica que su presencia en el consorcio no es deseable para conseguir altas velocidades de producción.

En el caso de las corridas 4 y 5 (DQO_{in} = 3300 mg/L y TRH de 24 y 36 h). *R. palustris* y el género *Rhodobacter* estuvieron presentes en proporciones similares, con una abundancia en conjunto, cercana al 50%. Mientras que en la corrida 6 (DQO_{in} = 3300 mg/L y TRH 48 h), la proporción de *R. palustris* disminuyó (16%) y la de *R. gelatinosus* incrementó (14%).

Otras especies detectadas en el consorcio pertenecen a los géneros de *Dysgonomonas* y *Pseudomonas* que han sido asociados a sistemas bioelectroquímicos (lugar de donde fue aislado el consorcio original), formando biopelículas (Hao et al., 2016). Estas especies utilizan sustratos orgánicos para crecimiento (Chen et al., 2016), pero no están asociadas a la producción de H₂. Sin embargo, *Pseudomonas* puede utilizar el acetato, butirato y propionato para producción de PHAs (Cerrone et al., 2014; Venkateswar Reddy et al., 2017). Los géneros *Dysgonomonas*, *Blastochloris* y *Pseudomonas* han sido encontrados en otros consorcios bacterianos aislados de lodos de plantas de tratamiento para producción de H₂ por fotofermentación, aunque su contribución en el consorcio no ha sido explorada (Ying et al., 2008; Chen et al., 2017).

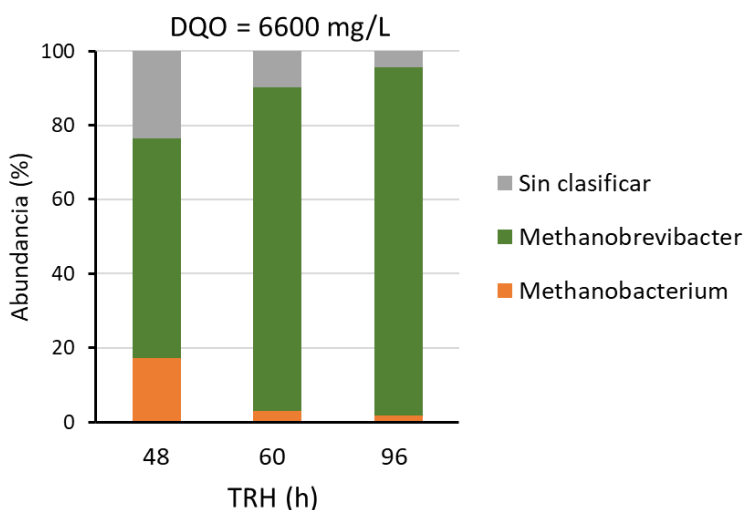


Figura 6.5. Arqueas identificadas en el consorcio microbiano durante la operación del fotobiorreactor.

En las corridas 1, 2 y 3 (DQO_{in} 6600 mg/L) también se detectó la presencia de arqueas (Figura 6.5), lo que podría explicar la disminución en la producción de H₂ con los TRH de 60 y 96 h. Aunque se detectaron arqueas en la corrida 1 (TRH = 48 h) no se observó producción de metano o disminución en la producción en esta condición. Es importante señalar, que los resultados no indican en que proporción se encontraban las arqueas con respecto a las bacterias o a las otras condiciones de cultivo. Debido a que el TRH fue más corto y la velocidad de crecimiento de las

arqueas es baja (Won and Lau, 2011), se puede deducir que éstas no crecieron lo suficiente como para afectar el funcionamiento del proceso. Los géneros detectados fueron *Methanobrevibacter* y *Methanobacterium*, que son arqueas hidrogenotróficas (Sarmiento et al., 2011; Siegert et al., 2015), producen CH₄ a partir de H₂ y CO₂ formado en el reactor, disminuyendo el rendimiento del proceso, ya que la reacción consume 4 moles de H₂ por mol de CH₄ formado. Para el TRH de 96 h se detectaron en promedio 32 mL/Ldía de CH₄ al final del proceso, lo que implica que se consumieron alrededor de 132 mL/Ldía de H₂.

Considerando los resultados de la producción de H₂ (Figura 6.2 y Tabla 6.3), se puede notar que en los TRH que resultaron más favorables para la producción de H₂, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodobacter blasticus* se encontraron en mayor proporción, lo que indica que estas especies son las responsables de la producción de H₂ en este estudio.

El desarrollo de *R. gelatinosus* se vio favorecido a los TRH más largos: 48 y 96 h con DQO_{in} de 3300 y 6600 mg/L, respectivamente (ambas condiciones con una CO = 1.65 g DQO/L). Esto indica que la velocidad de crecimiento de esta especie en los sustratos evaluados es menor a la de las otras especies de bacterias PNS o que su desarrollo se ve inhibido cuando la concentración de sustrato aumenta (aumento de la CO).

Debido al poco conocimiento que se tiene sobre *Blastochloris viridis*, es difícil entender su participación en el consorcio. A diferencia de *R. gelatinosus*, esta se presentó a TRH cortos (CO altas), lo que puede indicar que esta pudo desarrollarse cuando la disponibilidad de la fuente de carbono fue mayor o había mayor disponibilidad de algún otro nutriente en el medio que pueda resultar necesario para su desarrollo o incluso, que a TRH largos su crecimiento se vea afectado por la generación de algún producto de fermentación. El hecho de que posea otro tipo de pigmentos también puede restringir su crecimiento a ciertas zonas del reactor

(Miyake et al., 1999). Sin embargo, se requieren estudios más precisos para establecer la participación de *B. viridis* en el proceso. Un mayor conocimiento de la participación de las distintas especies en el consorcio requiere el aislamiento y evaluación de éstas de forma individual con los sustratos utilizados.

El hecho de que las arqueas identificadas fueron hidrogenotróficas, indica que además de controlar el TRH para evitar su crecimiento, es importante controlar el tiempo de residencia del biogás en el sistema. Durante la operación del reactor se observó que parte de las burbujas quedaban atrapadas en el soporte, éstas pueden ser usadas por las arqueas para la formación de metano, afectando la producción de H_2 . Se debe mantener una baja presión parcial de H_2 durante la operación. Un sistema de recirculación en el reactor o provocar la salida del biogás aplicando vacío cada cierto tiempo, podría ayudar a disminuir la producción de metano.

Los resultados de este estudio muestran que la inmovilización celular puede ser una alternativa para la operación en continuo en procesos fotofermentativos con consorcios microbianos sin el mantenimiento de condiciones estériles, sin embargo, las condiciones de operación influyen en la comunidad bacteriana y, por lo tanto, en la eficiencia del proceso. En contraste con otros estudios, se pudo trabajar con TRH cortos sin lavado de biomasa, se mantuvo una alta concentración celular en el sistema sin obstrucción al paso de luz y los TRH cortos permitieron la operación del reactor sin favorecer el desarrollo de microorganismos no productores de H_2 y de arqueas metanogénicas. Además, TRH cortos pueden ser ventajosos desde el punto de vista económico (Won and Lau, 2011). Sin embargo, el incremento en las velocidades de producción y conversiones de sustrato requieren de un mayor control del proceso y mayor estabilidad del consorcio microbiano.

6.4 Conclusiones

Los tiempos de retención hidráulica mayores a 48 h no resultaron apropiados para la producción de H_2 con el consorcio microbiano, debido a que favorecen el crecimiento de arqueas metanogénicas y otras especies microbianas que pueden consumir sustrato sin producción de biogás y afectar el desarrollo de las especies deseadas. Debido a que las arqueas identificadas fueron hidrogenotróficas, además de operar a TRH cortos, se requiere mantener una baja presión parcial de H_2 (eliminación continua del biogás) para que el rendimiento del proceso no se vea afectado. La producción de H_2 estuvo asociada a *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodobacter blasticus*. El uso de biomasa inmovilizada permitió mantener una alta concentración celular en el sistema sin obstrucción de la luz y sin lavado de biomasa a TRH cortos. La reducción de la DQO en el influente y operación a TRH menores no mejoró la producción de H_2 y el consumo de sustrato significativamente. Sin embargo, permitió una producción más estable de H_2 , sin decaimiento en la producción o aparición de metano a través del tiempo. La producción de H_2 y conversión de sustrato también se vio afectada por el cambio en la comunidad microbiana en el consorcio, por lo que la mejora en el proceso también requiere de una mayor estabilidad en el consorcio microbiano promoviendo condiciones que eviten el desarrollo de especies no productoras de H_2 .

Capítulo 7. Evaluación de la producción de hidrógeno en un fotobiorreactor en continuo con iluminación natural, alimentado con un efluente de fermentación oscura

Resumen

Las bacterias púrpuras fototróficas tienen la capacidad de producir H_2 a partir de Ácidos Grasos Volátiles (AGV's) contenidos en efluentes de fermentación oscura, representando una alternativa al tratamiento de estos residuos al reducir la Demanda Química de Oxígeno (DQO) con la obtención de un vector energético de valor agregado. En procesos en continuo la producción de H_2 se ve influenciada por el Tiempo de Retención Hidráulica (TRH) y en fotofermentaciones con luz solar, las condiciones ambientales también influyen en la productividad. El presente estudio evalúa la producción de H_2 en continuo con iluminación solar con TRH de 48 y 60 h a partir de un efluente de fermentación oscura usando un consorcio microbiano inmovilizado en fibras de luffa. Los experimentos fueron realizados en un reactor tubular de vidrio con un volumen de 400 mL. La caracterización del efluente de fermentación mostró que estaba compuesto principalmente de glucosa, ácido acético, butírico y propiónico. Se encontró que el TRH de 60 h permitió una mayor velocidad de producción de H_2 y conversión de sustrato (12.3 mL H_2 /L h_{luz} y 10.1% del sustrato consumido, respectivamente). Sin embargo, las producciones y eficiencias de conversión estuvieron limitadas por las condiciones climáticas. La producción de H_2 se restringe a un periodo aproximado de 8 h, por lo que la mayor parte del día el sustrato es suministrado sin que las condiciones ambientales sean favorables para la producción de H_2 . Asimismo, se observó que la radiación global diaria (cantidad de energía recibida por el sistema en un día) influye en el consumo de sustrato y producción de H_2 . Las mayores velocidades de producción de H_2 fueron alcanzadas cuando la radiación superó los 6000 Wh/m²día.

Artículos derivados de este capítulo:

Guevara-López, E., Monroy I., Buitrón G. Indoor and outdoor continuous hydrogen production by photofermentation: Effect of the HRT on the consortium microbial diversity and a process model (*En preparación*).

7.1 Introducción

El metabolismo fotoheterótrofo de las bacterias PNS les permite usar diversos compuestos orgánicos para crecimiento, sin embargo, en la producción de H_2 los ácidos orgánicos tales como acético, butírico y málico (AGV's), suelen ser más eficientes que los azúcares simples como glucosa y sacarosa (Hay et al., 2013). En contraste, en la fermentación oscura los microorganismos (anaerobios fermentativos) utilizan principalmente carbohidratos para la producción de H_2 , formando como subproductos de la fermentación, ácidos orgánicos (Bharathiraja et al., 2016).

Se sabe que la máxima productividad de H_2 , a partir de una determinada fuente de carbono, asumiendo conversión completa del sustrato a H_2 y CO_2 está dada por la ecuación (1.14). En el caso de un proceso fermentativo en fase oscura, se ha observado que en las mejores condiciones y suponiendo una fermentación acética, la oxidación de la glucosa conduce a la formación de máximo 4 moles de H_2 (Das and Veziroğlu, 2001). La combinación de procesos fermentativos en fase oscura y lumínica es una alternativa para mejorar la producción de H_2 (Chen et al., 2010). Mediante el uso de energía luminosa y bacterias PNS sería factible alcanzar hasta 8 moles de H_2 por mol de glucosa alimentado al proceso, adicionándose a los 4 moles obtenidos de la fermentación oscura (Hallenbeck and Ghosh, 2009). La combinación de fermentación oscura y lumínica puede ser un medio factible para conseguir altos rendimientos de H_2 , además de brindar la posibilidad de ser acoplado al tratamiento de aguas residuales. Esto no sólo permite incrementar la productividad global del proceso, sino que reduce la Demanda Química de Oxígeno (DQO) de los efluentes de la fermentación oscura (Chen et al., 2008b). El principal inconveniente del uso de efluentes se relaciona con la presencia de compuestos inhibitorios que pueden disminuir la producción de H_2 , entre estos el amonio (Akköse et al., 2009), por lo que pueden requerir pretratamientos (Argun and Kargi, 2010b).

El uso de efluentes de bajo costo, en combinación con iluminación solar representan una alternativa sustentable a la producción de H₂ (Miyake et al., 1999). Sin embargo, uno de los principales inconvenientes del uso de energía solar en la producción de H₂, es la naturaleza difusa de ésta y su baja densidad energética. Debido a que la intensidad de la luz incidente no es uniforme el cultivo puede encontrarse en ambos extremos, sometido a altas intensidades que originen fotoinhibición y periodos de ausencia de luz que detengan la producción y puedan modificar el metabolismo bacteriano (Koku et al., 2002). Los cambios en la temperatura también suelen afectar el proceso (Kim et al., 1982; Montiel-Corona et al., 2015). Se ha mostrado que uno de los factores de mayor influencia en la producción de H₂ con iluminación natural es la radiación global diaria (cantidad de energía que recibe el sistema en un día), observándose una mayor producción cuando ésta incrementa (Avcioglu et al., 2011; Boran et al., 2012). Aunque existen estudios de producción de H₂ con efluentes de fermentación oscura e iluminación solar (Avcioglu et al., 2011; Boran et al., 2012), muy pocos han sido realizados en continuo y en su mayoría han utilizado cultivos puros, requiriendo condiciones estériles.

El objetivo de este trabajo es evaluar el uso de energía solar en la producción de H₂ por fotofermentación con un consorcio microbiano inmovilizado usando un efluente de fermentación oscura con TRH de 48 h y 60 h.

7.2 Estrategia experimental

7.2.1 Inóculo y condiciones de cultivo

Se partió del mismo inóculo descrito en las secciones 4.2.1 y 4.3.5, el cual se cultivó en medio de crecimiento (Sección 3.3.1). Las condiciones de cultivo y recuperación de la biomasa también fueron descritas previamente (Sección 3.2). La

inmovilización del consorcio se llevó a cabo en el laboratorio (luz artificial), como se describe en la Sección 5.2.2.

Para la operación del reactor en continuo, se usó como medio de cultivo el efluente de reactor CSTR usado para producción de H₂ a partir de glucosa (Villa-Leyva, 2015). El efluente fue centrifugado y filtrado previo a su uso. Debido a que el reactor operó con carga orgánica variable, los efluentes recolectados se caracterizaron antes de ser usados para la fotofermentación determinando glucosa, composición de AGV's, solventes y amonio. La fuente de nitrógeno usada en la fermentación oscura fue NH₄Cl, por lo que el efluente contenía hasta 300 mg/L de amonio, que podrían inhibir el proceso fotofermentativo. Para disminuir esta concentración antes de la alimentación al proceso de fotofermentación, se hizo un pretratamiento que consistió en incrementar el pH a 10 con una solución de NaOH (10 M) y mantener el efluente en agitación hasta lograr una concentración de amonio de 50 mg/L (aproximadamente 8 horas) (Argun and Kargi, 2010a). Una vez desplazado el amonio, se ajustó el pH a 6.7.

Se hicieron las diluciones necesarias para mantener una concentración similar de AGV's durante la operación del reactor y una DQO constante a la entrada del fotofermentador de (8800 mg/L).

7.2.2 Fotobiorreactor y modo de operación

Los experimentos se llevaron a cabo en un reactor tubular de vidrio Pyrex de 2.54 cm de diámetro, con un volumen de trabajo de 400 mL (área irradiada \approx 400 cm²). El biorreactor fue inoculado con el consorcio microbiano inmovilizado en las fibras de luffa (120 mg de SV sobre 4.5 g de luffa seca, 300 mg SV/L de reactor). Se usó recirculación en el reactor con una velocidad de 40 mL/min para favorecer la salida del biogás y el mezclado en el reactor Figura 7.1. El reactor fue colocado verticalmente. La operación del reactor inició en lote con el efluente diluido por

cuatro días para adaptar el consorcio al nuevo medio y condiciones solares. Posteriormente se inició la alimentación en continuo con TRH de 48 y 60 h. El registro de las condiciones ambientales: temperaturas, intensidades luminosas y radiación global diaria fue proporcionado por la estación meteorológica de la UNAM, Campus Juriquilla (Levresse et al., 2015). Durante el tiempo que operó el reactor se mantuvo un promedio de 13 h luz/11 h oscuridad.

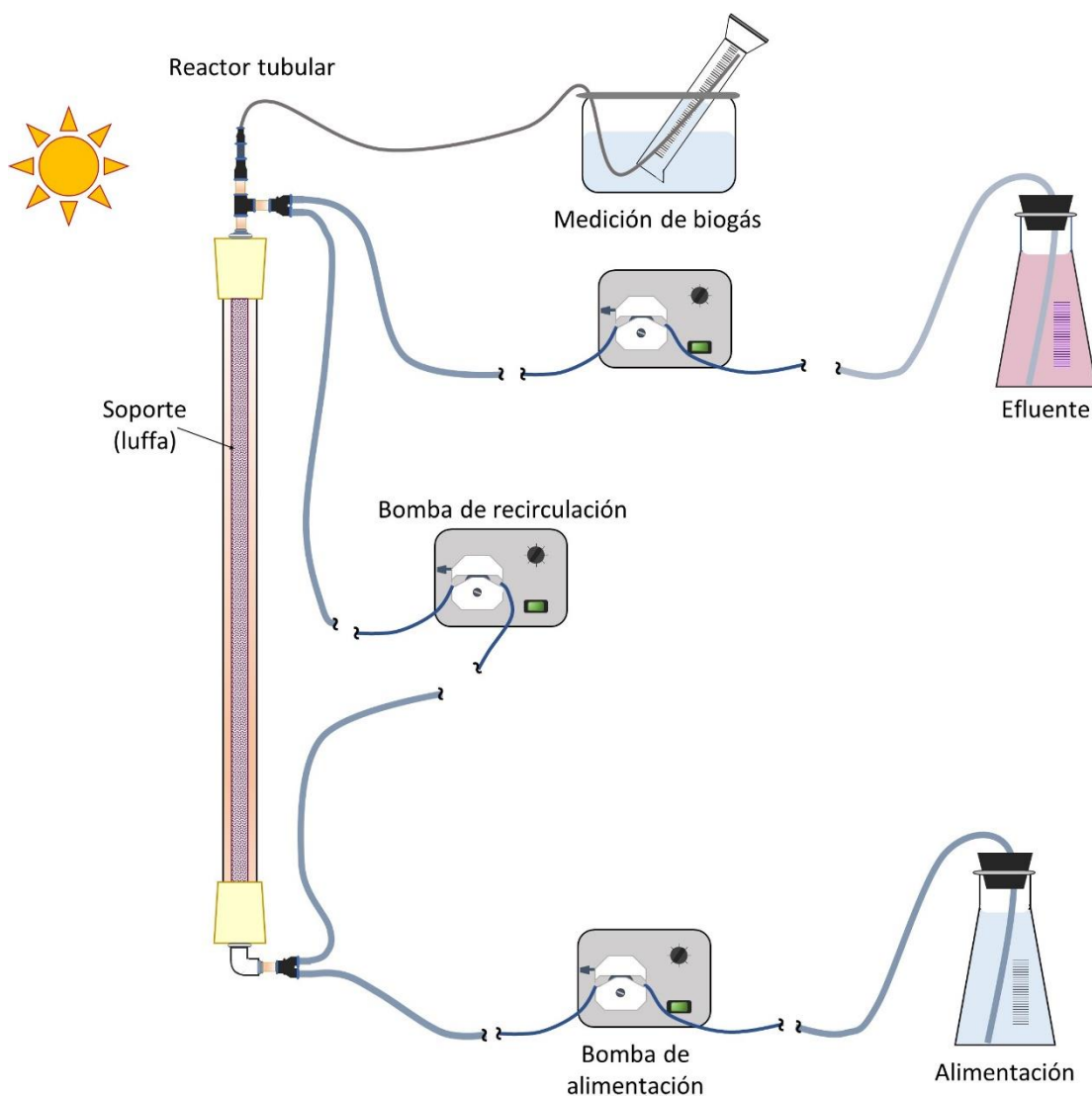


Figura 7.1. Esquema del sistema utilizado para la fotofermentación en continuo con luz solar.

7.2.3 Métodos analíticos

Durante los experimentos se evaluaron los SSV (Sección 3.4.2), AGV's y etanol (Sección 3.5.1), azúcares totales (glucosa) por el método del fenol:ácido sulfúrico (DuBois et al., 1956), pH (Sección 3.8), producción y composición del biogás (Sección 3.7), DQO_s (Sección 3.5.2), nitrógeno amoniacal (NH₃-N) (Sección 3.6.1) y concentración inicial y final de SV en el soporte (Sección 3.4.3). Los resultados de la producción de H₂ se presentan en condiciones estándar de presión y temperatura.

7.3 Resultados

7.3.1 Producción de hidrógeno en continuo con iluminación solar

En la Tabla 7.1 se muestra la composición de los efluentes alimentados al reactor, con una DQO ajustada a 8800 mg/L, para el proceso de fotofermentación en continuo. Aunque la composición del efluente varió, los principales componentes fueron acetato, propionato y butirato, ácidos grasos que están presentes en el medio sintético usado en los estudios previos.

El efluente también contenía glucosa, que también puede ser usado por las bacterias PNS para crecimiento y producción de H₂, aunque en la mayoría de las especies con menor eficiencia que en el caso de los ácidos grasos volátiles (Subudhi et al., 2016). Sin embargo, ciertas especies como *Rubrivivax gelatinosus* son más eficientes en el uso de glucosa como fuente de carbono que en el uso de acetato, propionato y butirato (Yang et al., 2012). Se ha reportado que la presencia de etanol en el medio de cultivo puede mejorar la producción de H₂, al modificar el balance redox en la célula (incremento en los niveles de NAD⁺ y NADP⁺), mejorando la actividad de la nitrogenasa (Oh et al., 2012; Kim et al., 2014). Sin embargo, se requieren concentraciones mayores a las encontradas en el efluente para observar estos efectos. Algunas especies de bacterias PNS también tienen la capacidad para

utilizar algunos alcoholes, entre ellos etanol, como fuente de carbono para crecimiento y producción de H₂ (Wu et al., 2010; Han et al., 2012).

Tabla 7.1. Composición de los efluentes de fermentación oscura usados en el proceso.

Componente	Concentración (mg/L)		
	Efluente 1	Efluente 2	Efluente 3
DQOs	8830	8810	8174
Glucosa	103	49	51
Acetato	1790	2300	2230
Propionato	477	1464	977
Butirato	2544	1224	1418
Valerato	-	177	173
Etanol	-	432	507
N-NH ₃	49.3	52.8	45.2

En la Figura 7.2 se muestra la producción de H₂ en continuo con iluminación solar. Las líneas verticales punteadas muestran el cambio de condición de lote a continuo con TRH de 48 h y con TRH de 60 h. Las flechas muestran el uso de los diferentes efluentes (1, 2 y 3, respectivamente). Aunque se detectaron burbujas de biogás al tercer día, la producción fue mínima. La producción de H₂ fue significativa después de 250 h de operación del reactor. Con un TRH de 48 h se alcanzó una producción de 49 mL/Ldía (3.4 mL/Lh_{luz}). Estas producciones fueron alcanzadas cuando la radiación global diaria superó los 6000 Wh/m²día. La intensidad luminosa máxima se mantuvo en 1148 ± 101 W/m². Se ha mencionado que intensidades por arriba de 1 kW/m² pueden ser inhibitorias de la producción de H₂ (Wakayama et al., 2000), sin embargo, en este estudio la mayor cantidad de biogás fue producido entre las 12:00 y 16:00 h, donde la intensidad luminosa se encontraba entre los valores máximos. El uso de biomasa inmovilizada puede ayudar a proteger a las células contra el daño por altas intensidades luminosas (fotoinhibición) al reducir la intensidad que llega al interior del reactor y evitar la formación de la biopelícula en la superficie, donde la incidencia de la luz es mayor (Miyake et al., 1999).

Durante la operación del reactor con un TRH de 48 h, la temperatura mínima se mantuvo en 14.8 ± 1.2 °C y la máxima en 28.8 ± 2.1 °C. Debido a que la temperatura ambiente se mantuvo más o menos estable durante la operación, no se apreció un efecto de las diferencias de temperatura entre un día y otro en la producción de H₂ durante la operación a un TRH de 48 h. Sin embargo, la disminución en la temperatura durante la noche y la reducida intensidad luminosa durante las primeras horas del día sí afectaron la producción. Boran et al. (2010) observaron que para la producción de H₂ se requería una intensidad de al menos 90 W/m². Durante la operación del reactor, el sol salía poco después de las 7:00 h, pero la intensidad luminosa superó los 100 W/m² hasta después de las 8:00 h. Sin embargo, la temperatura ambiente en ese momento se encontraba aún por debajo de los 20 °C. La producción de H₂ era significativa después de las 10:00 h de cada día, cuando la temperatura superaba los 20 °C. De igual forma, la producción decaía significativamente después de las 18:00 h, aun cuando la temperatura se mantenía arriba de los 20°C. Sin embargo, la intensidad luminosa después de esa hora podía caer de 500 W/m² a 50 W/m² en un periodo de 1 o 1.5 horas.

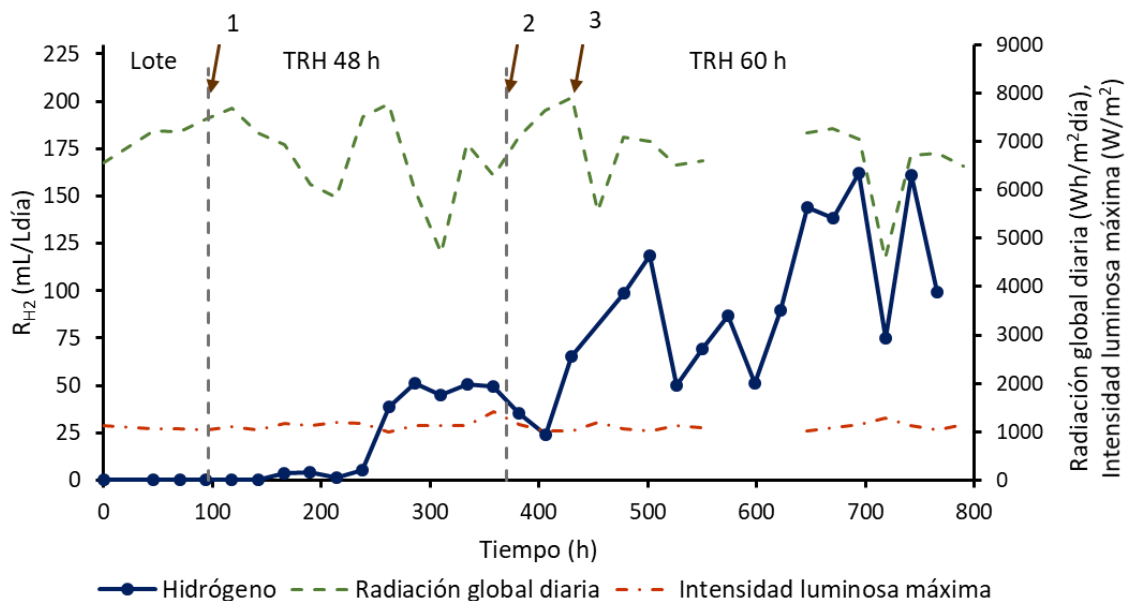


Figura 7.2. Producción de H₂ en continuo con iluminación solar

Cuando el TRH se incrementó a 60 h, la producción de H₂ mejoró, alcanzándose producciones alrededor de 160 mL/Ldía (12.3 mL/Lh_{luz}), 3.3 veces mayor al conseguido con el TRH de 48 h. La temperatura mínima fue 13.8 ± 1.0 °C y la máxima de 27.8 ± 2.0 durante el periodo de operación a TRH de 60 h. Al igual que con el TRH de 48 h, la producción fue insignificante antes de las 10:00 h y posterior a los 19:00 h. La intensidad luminosa máxima fue de 1104 ± 77.3 W/m². El comportamiento fue similar al observado con el TRH de 48 h, con la mayor producción de biogás (hasta 30 mL/Lh) entre las 12:00 y 16:00 h, donde las intensidades son máximas. En la Figura 7.2 se observa que la producción no alcanza un valor estable, sin embargo, la disminución o aumento en la producción de H₂ se relaciona con la radiación global diaria. Las mayores producciones de H₂ se encontraron a radiaciones cercanas a 7000 Wh/m²día. El efecto de la radiación global diaria ha sido reportado anteriormente por otros autores (Avcioglu et al., 2011; Boran et al., 2012).

Aun cuando no se tuvo control de pH, éste se mantuvo en 7.0 ± 0.2 para el TRH de 48 h y en 7.1 ± 0.2 °C durante la producción de H₂ con un TRH de 60 h. Se ha mencionado que cuando el pH inicial se mantiene cercano a la neutralidad, las bacterias PNS tienen la capacidad para autorregularlo, por otro lado, en procesos con iluminación solar, debido al cambio de metabolismo durante la oscuridad, el pH suele disminuir. Los SSV en el efluente fueron 31.2 ± 3.2 mg/L para el TRH de 48 h y 63.6 ± 5.3 mg/L para el TRH de 60 h. La estimación de la biomasa adherida al soporte al final del proceso dio un valor de 248 ± 19 mg SV en 4.5 g de soporte (622 mg SV/L). El crecimiento fue mínimo debido a que la única fuente de nitrógeno (necesario para el crecimiento) fue cloruro de amonio, el cual se redujo para evitar inhibición a 50 mg/L NH₃-N. En los efluentes se detectaron concentraciones menores a 0.2 mg/L de NH₃-N, mostrando que esto pudo limitar el crecimiento. Se ha reportado que la producción de H₂ puede suceder con baja o nula concentración de una fuente de nitrógeno (Kim et al., 2012; McKinlay et al., 2014), e incluso ésta puede favorecerse debido a que una menor cantidad de sustrato es desviada hacia

crecimiento y puede ser aprovechada en la producción de H₂, además de que la limitación de nitrógeno previene la inactivación de la nitrogenasa (Alef et al., 1981). Los estudios sin fuente de nitrógeno han demostrado que el sistema fotosintético de las bacterias PNS es bastante estable, al poder mantener la producción de H₂ sin adición de nitrógeno por periodos relativamente largos (Oh et al., 2004). Sin embargo, en algún momento el sistema puede verse afectado por la edad del cultivo (Koku et al., 2003).

7.3.2 Consumo de sustrato durante la operación en continuo con iluminación solar

La Figura 7.3 muestra la concentración de AGV's, carbohidratos y etanol en el efluente. Aunque dos de los efluentes de fermentación oscura contenían etanol, este no fue detectado a la salida del fotofermentador. Debido a que la concentración de etanol era baja y que se usó un consorcio microbiano, este pudo ser consumido por alguna de las especies presentes en la comunidad microbiana. La concentración de glucosa alimentada al reactor fue baja, contrario al etanol, esta fue detectada a la salida del reactor, mostrando que fue poco consumida por el consorcio. En procesos donde la fotofermentación se realiza con sustratos que combinan carbohidratos y ácidos grasos, el consumo de carbohidratos puede decrecer la producción de H₂, debido a que las bacterias pueden adaptar el metabolismo para consumo de los azúcares, afectando el de AGV's. Sin embargo, en este estudio, debido a la baja concentración de glucosa y a que el consumo de glucosa fue bajo, es poco probable que la presencia de ésta afectara el proceso. La porción consumida podría atribuirse a la presencia de especies con mayor afinidad hacia la glucosa que AGV's, como es el caso de *Rubrivivax gelatinosus*. El valerato puede ser usado por algunas especies para crecimiento (van Niel, 1944; Hiraishi et al., 1995), pero este no está asociado a la producción de H₂ por las especies presentes en el consorcio. La producción de H₂ se da principalmente por el consumo de acetato, propionato y butirato, sin embargo, aún estos ácidos fueron poco utilizados en este estudio.

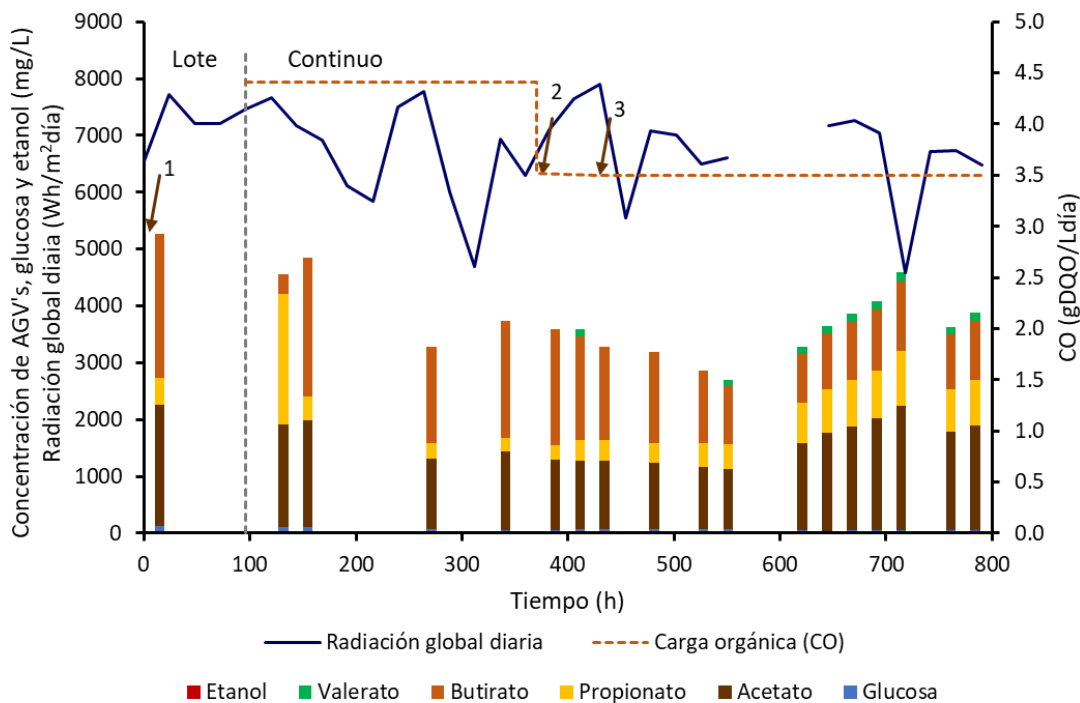


Figura 7.3. Concentración de AGV's, glucosa y etanol durante la operación en continuo con iluminación solar

La Tabla 7.2 muestra las producciones de H₂, eficiencias de conversión y reducción de DQO durante la operación del reactor con iluminación solar. Para el TRH de 48 h, sólo el uno por ciento del sustrato fue aprovechado en la producción de H₂ y con el TRH de 60 h el 3.7%. En ambas condiciones la remoción de DQO promedio fue cercana al 30%, sin embargo, para el TRH de 48 h sólo 3.3% del sustrato consumido se usó en la producción de H₂, mientras que en el TRH de 60 h se usó el 10.1%. El bajo consumo de sustrato y eficiencias de conversión puede tener varias causas, entre éstas, el cambio en las condiciones climáticas y la variación en la intensidad luminosa. Como se mencionó anteriormente, de las 24 h del día, la producción ocurre básicamente en un periodo de ocho horas (una tercera parte del día). Considerando que el sistema operó en continuo, dos terceras partes del día el sustrato fue alimentado sin posibilidad de ser utilizado para la producción de H₂. Se sabe que, durante los periodos de oscuridad, el crecimiento de las bacterias PNS tampoco se favorece y sólo una porción del sustrato puede

consumirse para actividades de mantenimiento (Androga et al., 2011b; Boran et al., 2012). No obstante, otras rutas metabólicas, como la producción de PHAs, podrían verse favorecidas con los ciclos luz/oscuridad (Eroğlu et al., 2008; Montiel Corona et al., 2017), consumiendo parte del sustrato. Además, al tratarse de un consorcio bacteriano, parte del sustrato también puede ser aprovechado por otras especies bacterianas cuyo metabolismo no depende de la luz. Todo esto conduce a bajo aprovechamiento del sustrato y remoción de materia orgánica.

Las producciones alcanzadas por metro cuadrado de superficie de soporte con el TRH de 60 h fueron similares a las encontradas con iluminación artificial, para el medio sintético conteniendo una DQO de 3300 mg/L (Tabla 6.3), aun cuando en esos experimentos se alcanzó una mayor concentración de biomasa inmovilizada. Sin embargo, eso no implica que una mayor cantidad de microorganismos estén participando en la conversión de sustrato. Los sistemas con biomasa inmovilizada son heterogéneos y es importante considerar la difusión del sustrato en la biopelícula (Klibanov, 1983; Zhang et al., 2014), además, en el caso de los sistemas fotofermentativos la disponibilidad de la luz en la biopelícula también es importante (Guo et al., 2011). Considerando esto, la biomasa adherida en zonas más internas de la estructura de las fibras podría encontrarse bajo limitación de luz y, por tanto, tener poca participación en el proceso.

Tabla 7.2. Producciones de H₂ y consumo de sustrato alcanzadas durante la operación del reactor con iluminación solar.

TRH (h)	mL H ₂ /Lh _{luz}	mLH ₂ /m ² h _{luz}	Y _{H₂} ^a (%)	Y _{H₂} ^c (%)	ΔDQO (%)
48	3.8	12.2	1.0	3.3	29.3
60	12.3	39.8	3.7	10.1	29.1

Y_{H₂}^a, conversión de sustrato calculado con respecto al sustrato alimentado.

Y_{H₂}^c, conversión de sustrato calculado con respecto al sustrato alimentado.

Los estudios realizados con iluminación solar para producción continua de H₂ han operado como sistemas en lote alimentado (fed-batch) o semi-continuo (Tabla 7.3). Se han preferido estas estrategias de alimentación sobre todo por la

capacidad para retener una mayor concentración de biomasa en el sistema (Padovani et al., 2016; Wu et al., 2016b). En sistemas con iluminación solar el lavado de biomasa con alimentación continua puede incrementarse debido al bajo o nulo crecimiento durante los periodos de oscuridad. Sin embargo, con excepción de los trabajos de Kim et al. (1987) y Özkan et al. (2012), las producciones son similares a las encontradas en este trabajo. Debido a que se trabajó con biomasa inmovilizada, el lavado no representó un inconveniente en este estudio.

Tabla 7.3. Comparación de la producción de H₂ con otros reactores operando con iluminación solar.

Especie microbiana	Sustrato	Reactor	R _{H2} mL/Lh _{luz}	Y _{H2} %	Reference
<i>R. sphaeroides</i>	Lactato	Panel plano	54.2	63	(Kim et al., 1987)
<i>R. capsulatus</i>	Acetato	Tubular	6.9	16 ^a	(Boran et al., 2010)
<i>R. capsulatus</i>	Efluente de FO (acetato, lactato y formiato)	Panel plano	11.2	50 ^c	(Avcioglu et al., 2011)
<i>R. capsulatus</i>	Acetato	Panel plano	11.4	53 ^c	(Androga et al., 2011b)
<i>R. capsulatus</i>	Efluente de FO (acetato)	Tubular	3.4	10 ^c	(Boran et al., 2012)
<i>R. capsulatus</i>	Efluente de FO (acetato)	Panel plano	25.0	77 ^a	(Özkan et al., 2012)
<i>R. capsulatus</i>	Melazas (sacarosa)	Tubular	6.9	3.7 ^c	(Kayahan et al., 2017)
Consortio microbiano	Efluente de FO (acetato, butirato y propionato)	Tubular	12.3	10.1 ^c	Este estudio

^a, calculado con base al sustrato alimentado

^b, calculado con base al sustrato consumido

En cuanto al consumo de DQO, Boran et al. (2012) reportaron 68% de remoción, sin embargo, la mayor parte del sustrato fue usado para crecimiento celular y funciones de mantenimiento y sólo un 10% se usó en la producción de H₂. Avcioglu et al (2011), reportaron una remoción del 9.5%, con un 50% del sustrato consumido utilizado en la producción de H₂.

Los estudios se han realizado en reactores de tipo tubular y panel plano por su relación área/volumen, que permiten una mejor distribución de la luz (Show et al., 2012). Asimismo, estos estudios se llevaron a cabo con biomasa suspendida y cultivos puros. *R. capsulatus* ha sido la especie más utilizada. Las bajas producciones encontradas en estos estudios son atribuidas a las condiciones climáticas, particularmente las variaciones en intensidad luminosa y la temperatura ambiente. Como se ha mencionado, la producción diaria se correlaciona principalmente con la radiación global (Androga et al., 2011b).

A pesar de que las producciones de este estudio fueron bajas, el uso del consorcio y biomasa inmovilizada puede representar una alternativa en la producción de H₂ en condiciones ambientales, al observar que los resultados fueron similares a los logrados con cultivos puros. El reactor se mantuvo en operación por un mes, tiempo comparable al de los otros estudios, sin que se observara contaminación o producción de metano. La producción está limitada principalmente por las condiciones ambientales y el tiempo efectivo para la producción de H₂. La mejora en la producción requiere el estudio de otras variables como la estrategia de alimentación y la carga orgánica en el sistema a fin de evitar que se pierdan altas concentraciones de sustrato o este se desvíe a otras rutas metabólicas durante los periodos de oscuridad o baja intensidad luminosa. Los estudios que reportaron mayores producciones y eficiencias de conversión se realizaron con concentraciones menores de sustrato y la producción de H₂ se dio a partir de un único ácido graso (Kim et al., 1987; Özkan et al., 2012). El control de la temperatura en el sistema a fin de evitar ambos extremos; temperaturas superiores a 40 °C cuando la intensidad es alta o temperaturas por debajo de 20 °C en los periodos de oscuridad, también puede mejorar la producción de H₂ en el exterior (Avcioglu et al., 2011; Boran et al., 2012). Debido a que la radiación global diaria es el factor de mayor influencia en la fotofermentación con luz solar, afectando tanto el consumo de sustrato como la producción de H₂, estrategias de control que permitan variar la

carga orgánica en función de ésta o de las variaciones en la intensidad luminosa, podrían ser una alternativa para la mejora del proceso.

7.4 Conclusiones

La luz solar permite la producción de H₂, sin embargo, además de los ciclos de oscuridad, el proceso se ve afectado por la variabilidad en la intensidad luminosa y la temperatura ambiente durante las horas de iluminación. Se observó producción de H₂ cuando la intensidad luminosa superó los 100 W/m² y la temperatura ambiente 20°C. Las máximas velocidades de producción de H₂ (alrededor de 30 mL/Lh) se presentaron cuando la intensidad luminosa fue máxima (cerca a 1 kW/m²). La producción diaria de H₂ y el consumo de sustrato se relacionan con la radiación global diaria, cuando ésta superó los 6000 Wh/m²día se alcanzaron las producciones y consumo de sustrato más altos. El tiempo de retención hidráulica de 60 h permitió alcanzar producciones de H₂ y conversiones de sustrato tres veces mayores a las alcanzadas con un tiempo de 48 h. Las producciones de H₂ alcanzadas con el consorcio microbiano inmovilizado fueron similares a las reportadas en la mayor parte de los estudios con iluminación solar usando cepas puras.

Capítulo 8. Efecto de la concentración de molibdeno, vanadio y hierro sobre la producción de hidrógeno y la actividad nitrogenasa

Resumen

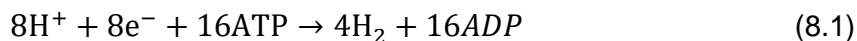
Las bacterias púrpuras fototróficas producen H_2 principalmente por acción de la enzima nitrogenasa. Se han descrito tres nitrogenasas: Mo-nitrogenasa, V-nitrogenasa y Fe-nitrogenasa. *Rhodospseudomonas palustris* es una de las pocas especies que contienen genes que codifican para las tres nitrogenasas. La presencia de Mo, V y Fe en el medio regulan la actividad de la nitrogenasa y por tanto la producción de H_2 . El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los tres metales sobre la actividad de la nitrogenasa y la producción de H_2 con un consorcio microbiano (mayoritariamente *R. palustris*) a partir de una mezcla de acetato, butirato y propionato. Los resultados mostraron que la producción de H_2 requiere la presencia de hierro, aunque puede presentarse en ausencia de molibdeno y vanadio. Aunque la producción ocurre a través de la Mo-nitrogenasa, una nitrogenasa alternativa puede activarse en ausencia de Mo. El Fe y el Mo pueden incrementar el volumen de H_2 y la velocidad de producción de éste. El análisis de superficie de respuesta predice que se puede alcanzar una $H_{m\acute{a}x}$ de 2070 mL/L y una $R_{m\acute{a}x}$ de 20.2 mL/Lh con una concentración de Fe y Mo de 11.7 y 1.1 mg/L, respectivamente. La actividad enzimática sólo fue afectada por la concentración de hierro en el medio, el aumento en la producción de H_2 correlacionó con el incremento de la actividad enzimática.

8.1 Introducción

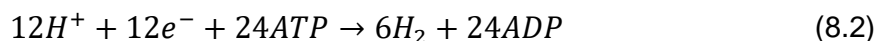
La producción de H_2 por bacterias púrpuras fototróficas se debe principalmente a la acción de la enzima nitrogenasa, una metaloproteína presente en la membrana celular cuya función principal es la de catalizar la fijación de N_2 , sin embargo, en ausencia de éste puede catalizar la producción de H_2 (Dasgupta et al., 2010; Rai and Singh, 2016).

Se han identificado tres tipos de nitrogenasas que, en ausencia de nitrógeno, producen H₂ de la siguiente manera (McKinlay and Harwood, 2010b; Basak et al., 2014):

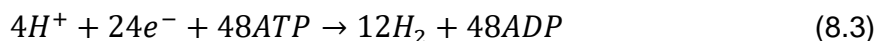
Molibdeno nitrogenasa (Mo-nitrogenasa):



Vanadio nitrogenasa (V-nitrogenasa):



Hierro nitrogenasa (Fe-nitrogenasa):



La producción de H₂ por acción de la nitrogenasa es irreversible y requiere cuatro moles de ATP por mol de H₂ formado. Una mayor producción de H₂ puede conseguirse cuando se incrementa la expresión o actividad de la nitrogenasa (Ghosh et al., 2012; Yang et al., 2015; Wang et al., 2016).

Todos los organismos fototróficos poseen genes que codifican para la Mo-nitrogenasa, que posee un cofactor compuesto por Fe y Mo (Vignais et al., 1985; Li and Fang, 2009). Su expresión requiere la presencia de Mo en el medio de cultivo (Sakurai et al., 2013). La tasa de conversión de esta enzima es baja, por lo que se requiere la síntesis de grandes cantidades de la misma para la producción de H₂ (Kars et al., 2006).

Se han reportado tres especies de bacterias púrpuras fototróficas: *Rhodobacter capsulatus* (Siemann et al., 2002), *Rhodospirillum rubrum* (Lehman

and Roberts, 1991) y *Rhodopseudomonas palustris* que contienen nitrogenasas adicionales, la Fe-nitrogenasa con cofactor FeFe o la V-nitrogenasa con cofactor FeV. *R. palustris* posee genes que codifican para las tres nitrogenasas (Larimer et al., 2004).

Las V y Fe-nitrogenasa pueden catalizar la producción de una mayor cantidad de H₂ que la Mo-nitrogenasa (Oda et al., 2005). Se ha observado que estas enzimas se expresan en ausencia de Mo y presencia de V y en ausencia de Mo y V, respectivamente (Sakurai et al., 2013). Sin embargo, en un estudio realizado por Oda et al. (2005), se menciona que los mecanismos de regulación de la expresión de las tres nitrogenasas puede responder a otros factores y no sólo a la disponibilidad de los metales en el medio y que la presencia de Mo en el medio no necesariamente reprime la síntesis de la V y Fe-nitrogenasa. En el caso de la V-nitrogenasa, se cree que ésta puede conferir ventajas selectivas a los microorganismos a temperaturas bajas y pH ácidos, ya que muestra actividad a temperaturas menores a 10°C y pH alrededor de 6 (Eady, 1996).

La nitrogenasa también cataliza la conversión de acetileno a etileno (Dilworth, 1966), por lo que esta reacción se ha usado para medir la actividad de la enzima (Hallenbeck et al., 1982; Fang et al., 2011). Mientras la Mo-nitrogenasa convierte el acetileno exclusivamente a etileno, la V y la Fe-nitrogenasa, pueden formar también etano (Oda et al., 2005).

Se han realizado estudios para encontrar las concentraciones de Fe y Mo que permitan incrementar la producción de H₂. Kars et al., (2006) evaluaron el efecto de las concentraciones de Fe y Mo sobre la producción de H₂ y la expresión de los genes relacionados con la Mo-nitrogenasa con *Rhodobacter sphaeroides* a partir de malato. Encontraron que al incrementar 100 veces la concentración de Mo (de 0.0158 a 1.58 mg/L) se incrementaba la producción de H₂ de 640 a 840 mL H₂/L, usando Fe en una concentración de 5.58 mg/L lograron alcanzar producciones de

1141 mL H₂/L. Usando un diseño de experimentos con superficie de respuesta para optimizar distintas variables (Castillo et al., 2012), incluyendo las concentraciones de Fe y Mo en la producción de H₂ con *Rhodobacter capsulatus* a partir de lactato, las concentraciones reportadas como óptimas fueron 0.154 mg/L de Mo y 10.9 mg/L de Fe. Fang et al. (2011), incrementaron la velocidad de producción de H₂ de *R. sphaeroides* a partir de lactato, casi tres veces al aumentar la concentración de Mo de 0.01 µg/L a 100 µg/L. Sin embargo, al evaluar la actividad nitrogenasa, no observaron una correlación entre la actividad de la enzima y la producción de H₂, explicando que la actividad de la enzima puede estar regulada por otros factores, además de la concentración de Mo.

Eroglu et al. (2011), usaron los resultados de Kars et al. (2006), para suplementar aguas residuales de la molienda de oliva con Mo y Fe y evaluar la producción de H₂ con *R. sphaeroides*. Al usar Mo la producción de H₂ incrementó 55% y al adicionar Fe esta se duplicó. Las mismas concentraciones fueron usadas para suplementar efluentes de fermentación oscura de hidrolizados de paja de cebada para producir H₂ con *R. capsulatus* (Özgür and Peksel, 2013), mejorando la producción alrededor de un 40%.

Sin embargo, el efecto del vanadio en la producción de H₂ aún no ha sido evaluado, debido a que pocas bacterias poseen la V-nitrogenasa, entre las que se encuentra *R. palustris*.

El presente estudio tuvo como finalidad evaluar el efecto del Fe, Mo y V en la producción de H₂ y actividad nitrogenasa con un consorcio microbiano compuesto principalmente por *R. palustris*. Se usó un diseño central compuesto a fin de optimizar las concentraciones de dichos metales que permitan incrementar la producción de H₂.

8.2 Estrategia experimental

8.2.1 Inóculo y condiciones de cultivo

Se usó el mismo inóculo descrito en las secciones 4.2.1 y 4.3.5, el cual se cultivó en medio de crecimiento (Sección 3.3.1). Las condiciones de cultivo y recuperación de la biomasa también fueron descritas previamente (Sección 3.2). La biomasa recuperada fue transferida a medio nuevo libre de Mo, Fe y V por dos semanas antes de iniciar el experimento.

8.2.2 Evaluación del efecto de la concentración de Mo, Fe y V en la producción de H₂

Para eliminar las trazas de metal en el material a utilizar, todo el material de vidrio fue lavado con una solución de HNO₃ al 30% (v/v) y posteriormente con agua destilada. Para remover las trazas de metales de la biomasa, ésta fue centrifugada y lavada diversas ocasiones con buffer de fosfatos (Kars et al., 2006).

Los experimentos se diseñaron en lote, usando botellas serológicas de 160 mL con 120 mL de volumen. Las botellas fueron inoculadas con 300 mg/L de SSV. El medio de cultivo se basó en el medio basal usado para el crecimiento del inóculo (Sección 3.3.1) conteniendo (mg/L): K₂HPO₄ 750, MgSO₄ 200, H₃BO₃ 2.80, ZnSO₄·7H₂O 0.24, MnSO₄·4H₂O 2.10, CuCl₂·2H₂O 0.04, CaCl₂·2H₂O 0.75, EDTA-Na 2.00, Vitamina B1 3.78 y Biotina 3.57. Se sustituyó el FeSO₄·7H₂O del medio original por C₆H₅FeO₇ y se incluyó Na₃VO₄. El C₆H₅FeO₇, Na₂MoO₄·2H₂O y Na₃VO₄ se agregaron en las cantidades necesarias para obtener las concentraciones de Fe, V y Mo definidas en la Tabla 8.1. Se usaron 1200 mg/L de ácido acético, 715 mg/L de ácido propiónico y 1571 mg/L de ácido butírico como fuente de carbono y 1880 mg/L de glutamato de sodio como fuente de nitrógeno (Cardeña et al., 2015). El pH inicial fue 6.5 y las botellas fueron irradiadas continuamente con lámparas de

tungsteno a 221 W/m². Durante los experimentos se evaluó la producción de biogás y composición del mismo. Los datos fueron ajustados al modelo de Gompertz (5.1) (Mu et al., 2006).

Tabla 8.1. Diseño Central Compuesto para evaluar el efecto del Fe, Mo y V sobre la producción de H₂ y actividad nitrogenasa.

Corrida	Fe (mg/L) X ₁		Mo (mg/L) X ₂		V (mg/L) X ₃	
	Código	Valor	Código	Valor	Código	Valor
Blanco	-1.682	0	-1.682	0	-1.682	0
6	1.000	11.00	1.000	1.26	-1.000	0.13
13	0.000	6.90	-1.682	0.00	0.000	0.32
1	-1.000	2.80	-1.000	0.32	-1.000	0.13
16 (C)	0.000	6.90	0.000	0.79	0.000	0.32
5	1.000	11.00	-1.000	0.32	-1.000	0.13
10	1.682	13.80	0.000	0.79	0.000	0.32
15 (C)	0.000	6.90	0.000	0.79	0.000	0.32
8	1.000	11.00	1.000	1.26	1.000	0.51
4	-1.000	2.80	1.000	1.26	1.000	0.51
9	-1.682	0.00	0.000	0.79	0.000	0.32
7	1.000	11.00	-1.000	0.32	1.000	0.51
11	0.000	6.90	0.000	0.79	-1.682	0.00
2	-1.000	2.80	1.000	1.26	-1.000	0.13
14	0.000	6.90	1.682	1.58	0.000	0.32
3	-1.000	2.80	-1.000	0.32	1.000	0.51
12	0.000	6.90	0.000	0.79	1.682	0.64

8.2.3 Diseño Experimental

Para evaluar el efecto de la concentración de los tres metales sobre la producción de H₂ y la actividad nitrogenasa y optimizar dichas concentraciones para incrementar la producción de H₂ se realizó un Diseño Central Compuesto (DCC) (Tabla 8.1). Adicionalmente, se introdujo un blanco sin metales añadidos en el medio de cultivo. Se realizaron ANOVAs para determinar el efecto de la

concentración de los tres metales sobre las variables de respuesta usando el software comercial Statgraphics Centurion v15.1.0.2 © StatPoint, Inc.

8.2.4 Evaluación de la actividad nitrogenasa

Para evaluar la actividad nitrogenasa se usó la técnica de reducción de acetileno, basada en la capacidad de la nitrogenasa para convertir el acetileno a etileno en una reacción irreversible (Meyer et al., 1978; Sasikala et al., 1990). Las pruebas se hicieron en tubos de vidrio de 9 mL previamente lavados con ácido nítrico para remover las trazas de metales (Sección 8.2.2). Con una jeringa se extrajo una muestra de un mililitro de los cultivos en botellas serológicas, con las diferentes concentraciones de metales, después de 48 h de cultivo. Cada muestra se colocó en un tubo diferente y se les agregó un mililitro de medio de cultivo sin metales (Sección 8.2.2). Los tubos fueron gaseados con argón y sellados. Se agregó 1 mL de acetileno al espacio de cabeza con una jeringa. Los tubos fueron incubados con iluminación a 221 W/m². Después de 16 h de iluminación, se extrajo una muestra de gas del espacio de cabeza del cultivo, para analizarse por cromatografía de gases y determinar la concentración de etileno formada (Sección 8.2.5).

8.2.5 Técnicas analíticas

Las técnicas analíticas se describieron anteriormente: intensidad luminosa y pH (Sección 3.8), concentración de biomasa (Sección 3.4), DQO_s (Sección 3.5.2), cantidad y composición del biogás (Sección 3.7).

Para medir la concentración de acetileno y etileno se usó el mismo cromatógrafo usado para determinar la composición del biogás (SRI 8610C). El cromatógrafo operó con una temperatura inicial de la columna de 40°C, mantenida por 1 min. Posteriormente, ésta se incrementó a una velocidad de 35°C/min hasta llegar a una temperatura final de 150 °C. La temperatura final se mantuvo por 5 min.

Las temperaturas del inyector y detector se mantuvieron a 90 y 150 °C, respectivamente. Se usó nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 20 mL/min. El cromatógrafo se calibró con mezclas de acetileno y etileno en aire.

8.3 Resultados

Los experimentos se realizaron con biomasa suspendida debido a que se hicieron análisis de contenido de metales por absorción atómica del soporte y se detectó que la luffa contenía trazas de molibdeno y hierro, además de que podía absorber estos componentes del medio de cultivo durante el proceso de inmovilización. Al evaluar la composición de los metales en las fibras de luffa sin colonizar se encontraron trazas de los tres metales, en concentraciones de 13.07, 1.84 y 0.15 $\mu\text{g/g}$ soporte seco de Fe, Mo y V, respectivamente. En el caso de la luffa colonizada, las concentraciones para Fe, Mo y V fueron de 19.64, 0.60 y 0.15 $\mu\text{g/g}$ soporte seco. Se ha reportado que la luffa puede absorber metales (Oboh et al., 2011; Khan et al., 2015). Estos metales podrían ser liberados al medio nuevamente e influir en la producción de H_2 y actividad nitrogenasa.

8.3.1 Efecto de la concentración de Mo, Fe y V sobre la producción de H_2

En la Tabla 8.2 se observan las condiciones evaluadas de acuerdo con el DCC y el efecto de los metales sobre las cinéticas de producción de H_2 a través de los parámetros de Gompertz.

El ANOVA (Anexo A.3) demostró que para $H_{\text{máx}}$, los factores significativos son X_1 , X_2 y X_1^2 ($p = 0.0029, 0.0230$ y 0.0331 , respectivamente). Lo anterior indica que tanto la concentración de Fe, como la de Mo son indispensables para mantener una adecuada producción de H_2 , sin embargo, no se observó efecto de la concentración de V.

En la Tabla 8.2 se puede observar que las menores producciones se obtuvieron con el blanco (medio sin metales) y la corrida 9, medio sin Fe, pero conteniendo Mo y V. Se ha reportado que la producción de H₂ no ocurre en ausencia de Fe en el medio (Hakobyan et al., 2013). Lo anterior se debe al hecho de que las tres nitrogenasas requieren como cofactor al Fe. Además, el Fe es cofactor de diversos transportadores de electrones, como la ferredoxina y el citocromo, necesarios en el proceso fotosintético (Basak et al., 2014). La ausencia de Fe también inhibe la actividad de la ATPasa y afecta la síntesis de los pigmentos fotosintéticos (Hakobyan et al., 2013).

Tabla 8.2. Resultados de la producción de H₂, remoción de DQO y actividad nitrogenasa a las distintas concentraciones de Fe, Mo y V

Corrida	Metales (mg/L)			H _{máx} (mL H ₂ /L)	λ (h)	R _{máx} (mL H ₂ /Lh)	ΔDQO %	Etileno μmol/mgSSV
	Fe X ₁	Mo X ₂	V X ₃					
Blanco	0	0	0	31	51.7	2	35.9	1.9
6	11.00	1.26	0.13	1923	40.1	19.1	68.0	18.3
13	6.90	0.00	0.32	498	39.9	12.3	41.9	9.8
1	2.80	0.32	0.13	1184	33.4	15.3	58.8	19.7
16 (C)	6.90	0.79	0.32	1587	32.1	17.5	64.3	11.0
5	11.00	0.32	0.13	1628	30.7	15.6	66.9	20.7
10	13.80	0.79	0.32	1546	40.7	13.6	64.1	19.3
15 (C)	6.90	0.79	0.32	1583	32.3	17.8	63.6	10.5
8	11.00	1.26	0.51	1912	31.2	17.7	69.0	18.1
4	2.80	1.26	0.51	1243	30.1	13.8	68.8	11.6
9	0.00	0.79	0.32	76.8	51.3	2.1	40.3	2.0
7	11.00	0.32	0.51	1129	37.7	11.8	55.0	14.6
11	6.90	0.79	0.00	1565	40.1	18.8	66.9	11.5
2	2.80	1.26	0.13	1057	35.8	13.9	66.5	12.4
14	6.90	1.58	0.32	1561	38.2	18.6	67.5	14.9
3	2.80	0.32	0.51	1088	33.8	13.9	67.3	15.6
12	6.90	0.79	0.64	1406	36.9	17.7	64.5	15.3

Por otro lado, en el medio con ausencia de Mo (corrida 13), se observó que, aunque la producción fue baja, se alcanzaron valores mayores a los del blanco y la

corrida 9, lo que indica que, bajo esas condiciones, la producción se debe a la síntesis de una de las otras dos nitrogenasas: Fe-nitrogenasa o V-nitrogenasa. De acuerdo con lo reportado, en medio con ausencia de molibdeno y presencia de Fe y V, se expresaría la V-nitrogenasa, a menos que esta nitrogenasa no fuera funcional (Sakurai et al., 2013). Aunque el análisis de varianza no mostró influencia del V sobre la producción, esto pudo deberse a que en las otras condiciones hay Mo en el medio, por lo que ésta no se expresó. Se ha mencionado que la V y la Fe-nitrogenasa puede producir una mayor cantidad de H₂ que la Mo-nitrogenasa, sin embargo, también ha sido reportado que los requerimientos energéticos son mayores que en la Mo-nitrogenasa y la especificidad es menor (Oda et al., 2005; McKinlay and Harwood, 2010b). El estudio de Yang et al. (2015) mostró una mejor eficiencia del sistema Mo-nitrogenasa en la producción de H₂. No existen reportes de concentraciones óptimas de vanadio para la producción de H₂ con bacterias PNS, por lo que se requiere evaluar otras concentraciones (en ausencia de Mo) para determinar si es posible incrementar la producción de H₂ a través de la V-nitrogenasa. Al tratarse de un consorcio microbiano, la baja producción de H₂ también puede estar asociada a la participación de las otras especies. En general, sólo la Mo-nitrogenasa está presente en todas las especies de bacterias PNS, al no haber Mo en el medio, éstas no podrían contribuir a la producción de H₂.

Si la producción de H₂ se está realizando básicamente por acción de la Mo-nitrogenasa, la concentración de este componente en el medio es indispensable. Se ha demostrado que la suplementación del medio de cultivo con Mo o el incremento en la concentración pueden mejorar tanto el volumen de H₂ producido, como la velocidad de producción de H₂ (Eroglu et al., 2011; Fang et al., 2011).

Para este estudio, se obtuvo la ecuación (8.4) como resultado del análisis de regresión, la cual describe el efecto del Fe, Mo y V sobre H_{máx}, con un R² de 0.89 y R² ajustado de 0.75.

$$\begin{aligned}
 H_{m\acute{a}x} = & 77.12 + 251.00X_1 + 775.28X_2 - 483.89X_3 - 12.97X_1^2 \\
 & + 54.65X_1X_2 - 117.26X_1X_3 - 639.43X_2^2 + 895.05X_2X_3 \quad (8.4) \\
 & + 548.46X_3^2
 \end{aligned}$$

La Figura 8.1 muestra la superficie de respuesta que describe el comportamiento de $H_{m\acute{a}x}$ con respecto a las concentraciones de Fe y Mo para una concentración constante de V (0.32 mg/L). Se observa que el incremento en las concentraciones de Fe y Mo hasta cierto nivel incrementaron el volumen de H_2 producido. Altas concentraciones de uno de los minerales con bajas concentraciones del otro (presencia de sólo uno de los metales) no son favorable para la producción de H_2 , lo que correlaciona con la producción de H_2 a través del sistema Mo-nitrogenasa que requiere como cofactor a ambos compuestos. El análisis por superficie de respuesta predice que es posible alcanzar una producción de H_2 de 2092 mL/L con concentraciones de Fe y Mo de 12.5 y 1.2 mg/L, respectivamente.

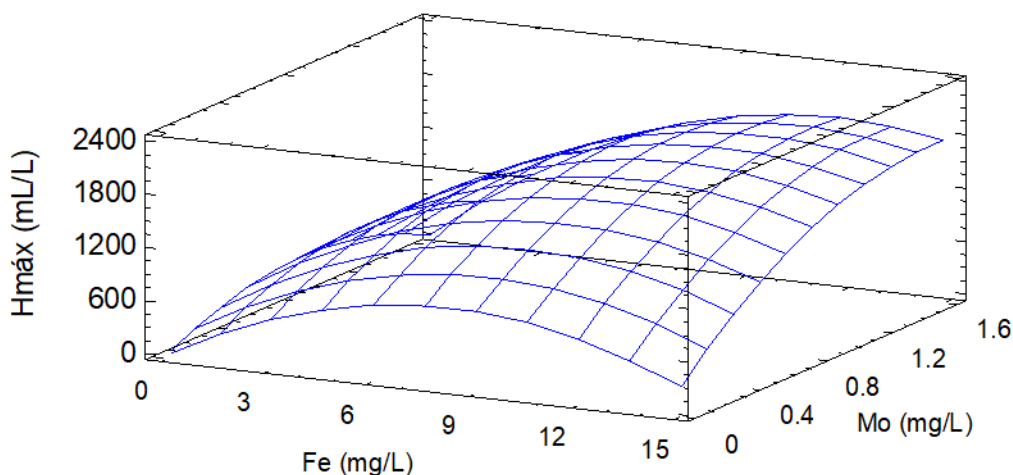


Figura 8.1. Superficie de respuesta para $H_{m\acute{a}x}$ en función de la concentración de Fe y Mo

En lo que respecta a la velocidad de producción de H_2 ($R_{m\acute{a}x}$) se observó que los términos significativos fueron de igual forma X_1 , X_2 y X_1^2 ($p = 0.0125, 0.0495$ y 0.0014 , respectivamente). Al igual que en el caso anterior, el Fe es el mineral que más influye en la velocidad de producción de H_2 por estar presente en las tres nitrogenasas y en los transportadores de electrones del sistema fotosintético. El

ANOVA (Anexo A.3) mostró que para el caso de $R_{m\acute{a}x}$, tampoco existe un efecto significativo del V sobre ésta. El análisis de regresión determinó la ecuación (8.5) para describir $R_{m\acute{a}x}$ en función de las concentraciones de Fe, Mo y V, con un R^2 de 0.91 y un R^2 ajustado de 0.80.

$$R_{m\acute{a}x} = 2.92 + 3.25X_1 + 4.54X_2 - 0.53X_3 - 0.21X_1^2 + 0.54X_1X_2 - 1.01X_1X_3 - 3.56X_2^2 + 1.54X_2X_3 + 1.60X_3^2 \quad (8.5)$$

El comportamiento de $R_{m\acute{a}x}$ con el cambio de concentraciones de Fe y Mo fue similar al observado con $H_{m\acute{a}x}$. El análisis por superficie de respuesta (Figura 8.2) predice que es posible alcanzar una máxima velocidad de producción de H_2 ($R_{m\acute{a}x}$) de 21.7 mL/Lh con 9.7 mg/L de Fe y 1.4 mg/L de Mo (en ausencia de V).

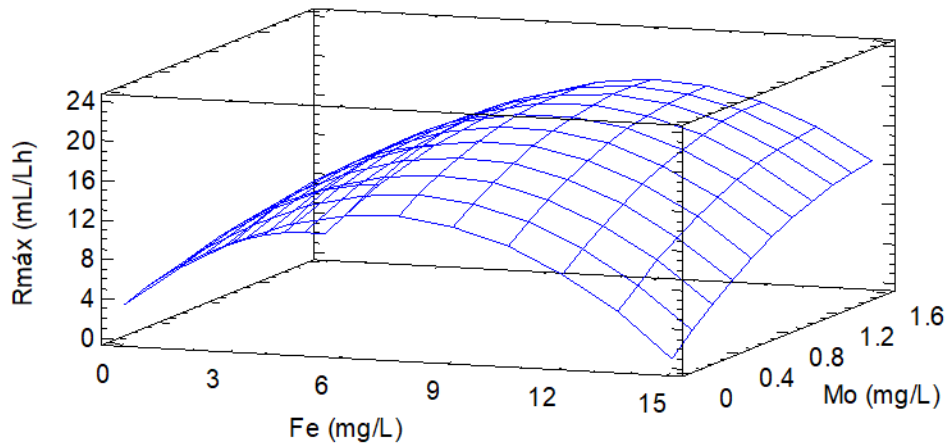


Figura 8.2. Superficie de respuesta para $R_{m\acute{a}x}$ en función de la concentración de Fe y Mo

No se observó dependencia de los otros factores, fase de latencia (λ) y remoción de DQO ($\Delta DQO, \%$) con respecto a las concentraciones de Fe, Mo y V. Se ha observado que aun cuando la producción de H_2 no se vea favorecida, el consumo de sustrato puede ser alto debido a la versatilidad metabólica de las bacterias PNS y el uso del sustrato en diferentes funciones (Madigan and Jung, 2009; Kim et al., 2014; Petushkova and Tsygankov, 2017). Otros microorganismos

presentes en el consorcio también contribuyen al crecimiento microbiano sin producción de H_2 (Lazaro et al., 2012).

De manera adicional, se realizó la optimización de las dos variables ($H_{\text{máx}}$ y $R_{\text{máx}}$). El análisis mostró que es posible maximizar ambas variables con concentraciones de Fe y Mo de 11.7 y 1.1 mg/L, respectivamente. A estas condiciones el análisis estima un $H_{\text{máx}}$ de 2070 mL/L y un $R_{\text{máx}}$ de 20.2 mL/Lh. Otros autores han reportado concentraciones similares a las reportadas en este estudio como óptimas para la producción de H_2 (Kars et al., 2006; Castillo et al., 2012).

8.3.2 Efecto de la concentración de Mo, Fe y V sobre la actividad nitrogenasa

En la Tabla 8.2 se muestra el efecto de los metales sobre la actividad nitrogenasa medida como producción de etileno (a partir de acetileno) en μmol de etileno/mg de SSV. Al igual que con la producción de H_2 , los valores más bajos se obtuvieron en las corridas sin metales y sin Fe en presencia de Mo y V. El medio sin Mo, conteniendo V y Fe también mostró una baja conversión de etileno. Sin embargo, a diferencia de la producción de H_2 , el ANOVA (Anexo A.3) para un diseño trifactorial sólo mostró efecto del Fe sobre la actividad enzimática. Como se mencionó previamente, el hierro no sólo es cofactor de la nitrogenasa, también es cofactor de diversos transportadores de electrones, que son necesarios para la síntesis de ATP (Hakobyan et al., 2013), por lo que su presencia es indispensable para la producción de H_2 .

Aunque el molibdeno es cofactor de la Mo-nitrogenasa, el que no se haya visto efecto de la concentración de éste sobre la actividad puede estar relacionado con la complejidad de la regulación de la enzima. Se sabe que la nitrogenasa está regulada principalmente por la presencia de nitrógeno y amonio en el medio y el balance redox de la célula (Oda et al., 2005). Aunque la concentración de metales

puede afectar la regulación y actividad de la enzima, el efecto de estos dependerá de la disponibilidad de nitrógeno en el sistema y otros factores como el oxígeno y la intensidad luminosa (Eady, 1996; Masepohl et al., 2002). La temperatura también puede afectar en la síntesis de la enzima (Krahn et al., 1996). Un estudio realizado por Fang et al. (2011) mostró que, aunque la producción de H₂ puede mejorarse a ciertas concentraciones de Mo, esto no implicaba una correlación con la actividad enzimática, lo que atribuyen a la complejidad de la regulación enzimática.

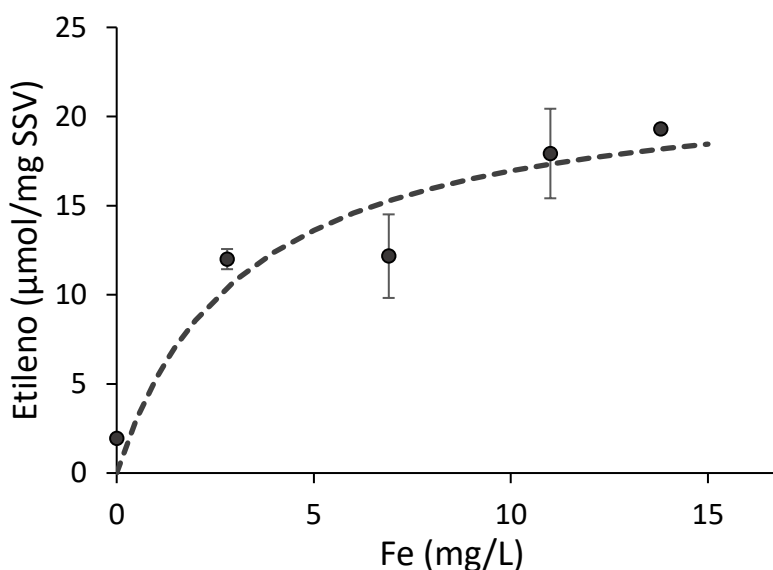


Figura 8.3. Efecto de la concentración de Fe en la actividad nitrogenasa

En la Figura 8.3 se muestra el efecto de la concentración de Fe sobre la actividad de la enzima. Los datos fueron ajustados con el modelo de Michaelis-Menten. Se observa que al incrementar la concentración de hierro de 0 a 4 mg/L la actividad mejoró considerablemente, alcanzando un valor alrededor de 12 μg etileno/mg SSV. Posteriormente, el incremento en la concentración de Fe de 10 mg/L sólo incrementó la actividad en 6 μg etileno/mg SSV.

El modelo predice una K_m de 3.2 mg Fe/L y una $V_{m\acute{a}x}$ de 22.4 μg etileno/mg SSV. Comparando con la producción de H₂, el análisis por superficie de respuesta

muestra una concentración óptima para el Fe de 11.7 mg/L, valor al cual se obtendría una actividad enzimática cercana a la máxima (18 μg etileno/mg SSV). Lo que indica que la mejora en la producción de H_2 al mejorar la concentración de hierro en el medio si está relacionada con el incremento de la actividad enzimática.

8.4 Conclusiones

La concentración de Fe y Mo en el medio afectan tanto el volumen máximo de H_2 producido ($H_{\text{máx}}$), como la velocidad máxima de producción de éste ($R_{\text{máx}}$). La producción de H_2 en el sistema ocurre a través de la Mo-nitrogenasa. Aunque en ausencia de molibdeno se observó producción de H_2 , indicando que la V-nitrogenasa se activa en estas condiciones, esta enzima no fue tan eficiente en la producción de H_2 como la Mo-nitrogenasa. El hierro es el metal con mayor influencia sobre la producción de H_2 y la actividad de la enzima con el consorcio estudiado, al estar presente como cofactor en la enzima y en diversos transportadores de electrones del sistema fotosintético. Aunque la producción de H_2 puede ocurrir en ausencia de V y Mo, la presencia de hierro es indispensable. Las concentraciones óptimas para maximizar $H_{\text{máx}}$ y $R_{\text{máx}}$ fueron 11.7 mg/L de Fe y 1.1 mg/L de Mo. El hierro afectó la actividad de la enzima, la mayor producción de H_2 correlaciona con el incremento en la actividad enzimática.

Conclusiones Generales

La finalidad de este trabajo fue evaluar el efecto de distintos factores que afectan la fotofermentación a fin de incrementar la producción de H₂ usando consorcios microbianos inmovilizados.

El consorcio microbiano de bacterias púrpuras fototróficas fue inmovilizado en fibras de luffa. Con este soporte se obtuvo la mayor cantidad de biomasa inmovilizada por unidad de volumen entre los soportes evaluados. La inmovilización del consorcio evitó el lavado celular durante la operación en continuo, trabajando con concentraciones superiores a 1 g SSV/L, aun cuando el reactor operó con tiempos cortos de retención hidráulica (TRH) (menores a 48 h). En la operación con iluminación solar, la inmovilización también protegió a las bacterias contra fotoinhibición, observándose las mayores velocidades de producción de H₂ (30 mL/Lh) en las horas en que la intensidad luminosa se encontraba alrededor de 1 kW/m².

Se utilizó un consorcio microbiano, identificándose a *Rhodopseudomonas palustris* como especie mayoritaria (72%). Con el consorcio inicial fue posible alcanzar velocidades de producción de 14 mL/Lh, similares a otros trabajos en la literatura que usaron cepas puras. Este hecho permite concluir que el uso de los consorcios microbianos es una opción viable cuando se mantienen condiciones de operación que favorecen el desarrollo de especies productoras de H₂. Se evidenció que el TRH afecta la comunidad microbiana presente en el consorcio, cuando la concentración del sustrato en el influente permanece constante. La operación con TRH cortos (menores a 48 h) permitió mantener una mayor proporción de especies productoras de H₂, particularmente *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodobacter blasticus*. Por el contrario, operando a TRH largos (mayores a 48 h) se favorece el desarrollo de especies que pueden consumir el sustrato con poca o nula producción de H₂, como *Rubrivivax gelatinosus*,

Blastochloris viridis y *Dysgonomonas*. Con TRH largos también se promovió el desarrollo de arqueas hidrogenotróficas, de los géneros *Methanobrevibacter* y *Methanobacterium*, que afectaron el rendimiento del proceso al consumir parte del H₂ producido.

Tanto la producción de H₂ como el consumo de DQO se ven afectadas por el pH inicial, tipo de iluminación e intensidad luminosa. Las lámparas de tungsteno permiten una mayor producción de H₂ debido a que proporcionan un espectro continuo que cubre todo el espectro de absorción de los pigmentos fotosintéticos. Por otro lado, una longitud de onda única (590 nm) proporcionada por las lámparas de LED amarillo no permitió la producción de H₂ con el consorcio microbiano evaluado. La optimización por superficie de respuesta mostró que es posible incrementar la producción, velocidad de producción de H₂ y la remoción de DQO cuando el pH inicial es 6.5 y la intensidad luminosa 221 W/m².

Se operó un reactor en continuo con iluminación artificial y ciclos de luz/oscuridad. Se observó que la producción de H₂ y el consumo de ácidos grasos volátiles se favorecieron a TRH cortos (menores a 48 h) que evitaron el desarrollo de microorganismos no productores de H₂. Las velocidades de producción alcanzadas fueron 1.9 veces mayores a las alcanzadas en la operación en lote. Sin embargo, se obtuvieron bajas conversiones de sustrato (menores a 10% del sustrato alimentado) y de remoción de DQO (menores a 50%). La conversión de sustrato se vio limitada por la baja velocidad de consumo de sustrato por las bacterias púrpuras fototróficas en los periodos de oscuridad.

Cuando el reactor se operó bajo iluminación natural, se obtuvieron velocidades de producción de H₂ y conversiones de sustrato tres veces mayores a un THR de 60 h que con un TRH de 48 h. Además de los ciclos de oscuridad, la fotofermentación en condiciones ambientales también fue afectada por la variabilidad en la temperatura y la intensidad luminosa. La producción de H₂ ocurrió

cuando la intensidad luminosa superó los 100 W/m^2 y la temperatura ambiente fue mayor a 20°C , lo que limitó la producción a una tercera parte del día. La producción de H_2 y el consumo de sustrato se relaciona con la radiación global diaria, alcanzándose mayores producciones cuando ésta superó los $6000 \text{ W/m}^2\text{día}$.

De la evaluación del efecto del hierro, vanadio y molibdeno se concluye que tanto el hierro como el molibdeno afectan la producción de H_2 , mientras que la actividad nitrogenasa sólo se vio afectada por la concentración de Fe. Las concentraciones óptimas para maximizar la producción de H_2 fueron 11.7 mg/L de Fe y 1.1 mg/L de Mo. La producción de H_2 no ocurrió en ausencia de hierro, aunque sí en ausencia de V y Mo. El hierro es indispensable para la producción de H_2 debido a que es cofactor de las tres nitrogenasas y de distintos transportadores de electrones. La producción de H_2 con el consorcio evaluado se lleva a cabo por acción de la Mo-nitrogenasa cuando el Mo está presente en el medio. En ausencia de Mo y presencia de V y Fe la producción se atribuye a la actividad de la V-nitrogenasa. La V-nitrogenasa mostró una menor eficiencia para la producción de H_2 que la Mo-nitrogenasa, al observarse una menor producción de H_2 cuando el medio de cultivo careció de Mo.

Finalmente, aunque la producción en continuo (con iluminación artificial) permitió obtener velocidades de producción mayores a los experimentos previos (en lote), la producción de H_2 con iluminación solar y el escalamiento del proceso requiere aún más investigación y un mayor control del proceso. La producción en continuo en el exterior presenta limitaciones debido a que la producción de H_2 y el crecimiento no ocurren durante todo el día. Aun cuando la biomasa inmovilizada evita el lavado celular durante la operación, el nulo aprovechamiento del sustrato durante los periodos de oscuridad o baja iluminación y temperatura repercuten en los rendimientos del proceso. La investigación debe dirigirse hacia estrategias diferentes de operación del reactor y sistemas de control de temperatura que disminuyan el efecto de los factores ambientales sobre la producción de H_2 . La

captación de energía solar durante los periodos de iluminación, para su aprovechamiento en iluminación a fin de reducir los periodos de oscuridad, también podrían ofrecer una alternativa para superar los bajos rendimientos del proceso.

Referencias

- Abo-Hashesh, M., Desautay, N., and Hallenbeck, P.C. 2013. High yield single stage conversion of glucose to hydrogen by photofermentation with continuous cultures of *Rhodobacter capsulatus* JP91. *Bioresour Technol.* 128:513–517.
- Adessi, A., Concato, M., Sanchini, A., Rossi, F., and De Philippis, R. 2016. Hydrogen production under salt stress conditions by a freshwater *Rhodospseudomonas palustris* strain. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100:2917–2926.
- Adessi, A., Corneli, E., and De Philippis, R. 2017. Photosynthetic Purple Non Sulfur Bacteria in Hydrogen Producing Systems: New Approaches in the Use of Well Known and Innovative Substrates. In: P.C. Hallenbeck, ed. *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes*. Cham: Springer International Publishing. pp. 321–350.
- Adessi, A., and De Philippis, R. 2014. Photobioreactor design and illumination systems for H₂ production with anoxygenic photosynthetic bacteria: A review. *Int J Hydrog Energy.* 39:3127–3141.
- Adessi, A., Torzillo, G., Baccetti, E., and De Philippis, R. 2012. Sustained outdoor H₂ production with *Rhodospseudomonas palustris* cultures in a 50 L tubular photobioreactor. *Int J Hydrog Energy.* 37:8840–8849.
- Akkerman, I., Janssen, M., Rocha, J., and Wijffels, R.H. 2002. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *Int J Hydrog Energy.* 27:1195–1208.
- Akköse, S., Gündüz, U., Yücel, M., and Eroglu, I. 2009. Effects of ammonium ion, acetate and aerobic conditions on hydrogen production and expression levels of nitrogenase genes in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *Int J Hydrog Energy.* 34:8818–8827.
- Akman, M.C., Erguder, T.H., Gündüz, U., and Eroglu, I. 2015. Investigation of the effects of initial substrate and biomass concentrations and light intensity on photofermentative hydrogen gas production by response surface methodology. *Int J Hydrog Energy.* 40:5042–5049.
- Akroum-Amrouche, D., Abdi, N., Lounici, H., and Mameri, N. 2011. Effect of physico-chemical parameters on biohydrogen production and growth characteristics by batch culture of *Rhodobacter sphaeroides* CIP 60.6. *Appl Energy.* 88:2130–2135.
- Alef, K., Arp, D.J., and Zumft, W.G. 1981. Nitrogenase switch-off by ammonia in *Rhodospseudomonas palustris*: Loss under nitrogen deficiency and independence from the adenylation state of glutamine synthetase. *Arch Microbiol.* 130:138–142.
- Androga, D.D., Özgür, E., Eroglu, I., Gündüz, U., and Yücel, M. 2011a. Significance of carbon to nitrogen ratio on the long-term stability of continuous photofermentative hydrogen production. *Int J Hydrog Energy.* 36:15583–15594.

- Androga, D.D., Ozgur, E., Gunduz, U., Yucel, M., and Eroglu, I. 2011b. Factors affecting the longterm stability of biomass and hydrogen productivity in outdoor photofermentation. *Int J Hydrog Energy*. 36:11369–11378.
- Androga, D.D., Sevinç, P., Koku, H., Yücel, M., Gündüz, U., and Eroglu, I. 2014. Optimization of temperature and light intensity for improved photofermentative hydrogen production using *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710. *Int J Hydrog Energy*. 39:2472–2480.
- Androga, D.D., Uyar, B., Koku, H., and Eroglu, I. 2016. Implementation and analysis of temperature control strategies for outdoor photobiological hydrogen production. *Bioprocess Biosyst Eng*. 39:1913–1921.
- APHA. 1999. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington, D. C.: American Public Health Association.
- Archana, A., Sasikala, C., and Ramana, C.V. 2003. Augmentation of H₂ photoproduction in *Rhodospseudomonas palustris* by N-heterocyclic aromatic compounds. *Biotechnol Lett*. 25:79–82.
- Argun, H., and Kargi, F. 2010a. Bio-hydrogen production from ground wheat starch by continuous combined fermentation using annular-hybrid bioreactor. *Int J Hydrog Energy*. 35:6170–6178.
- Argun, H., and Kargi, F. 2010b. Photo-fermentative hydrogen gas production from dark fermentation effluent of ground wheat solution: Effects of light source and light intensity. *Int J Hydrog Energy*. 35:1595–1603.
- Assawamongkholisiri, T., and Reungsang, A. 2015. Photo-fermentational hydrogen production of *Rhodobacter* sp. KKU-PS1 isolated from an UASB reactor. *Electron J Biotechnol*. 18:221–230.
- Avcioglu, S.G., Ozgur, E., Eroglu, I., Yucel, M., and Gunduz, U. 2011. Biohydrogen production in an outdoor panel photobioreactor on dark fermentation effluent of molasses. *Int J Hydrog Energy*. 36:11360–11368.
- Bakonyi, P., Nemestóthy, N., and Bélafi-Bakó, K. 2013. Biohydrogen purification by membranes: An overview on the operational conditions affecting the performance of non-porous, polymeric and ionic liquid based gas separation membranes. *Int J Hydrog Energy*. 38:9673–9687.
- Balat, M. 2008. Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems. *Int J Hydrog Energy*. 33:4013–4029.
- Balat, M., and Balat, M. 2009. Political, economic and environmental impacts of biomass-based hydrogen. *Int J Hydrog Energy*. 34:3589–3603.
- Ball, M. 2009. Why hydrogen? In: M. Ball, and M. Wietschel, eds. *The Hydrogen Economy*. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 8–45.
- Ball, M., and Wietschel, M. 2009. The future of hydrogen – opportunities and challenges. *Int J Hydrog Energy*. 34:615–627.
- Basak, N., and Das, D. 2007. The Prospect of Purple Non-Sulfur (PNS) Photosynthetic Bacteria for Hydrogen Production: The Present State of the Art. *World J Microbiol Biotechnol*. 23:31–42.

- Basak, N., and Das, D. 2009. Photofermentative hydrogen production using purple non-sulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in an annular photobioreactor: A case study. *Biomass Bioenergy*. 33:911–919.
- Basak, N., Jana, A.K., and Das, D. 2016. CFD modeling of hydrodynamics and optimization of photofermentative hydrogen production by *Rhodospseudomonas palustris* DSM 123 in annular photobioreactor. *Int J Hydrog Energy*. 41:7301–7317.
- Basak, N., Jana, A.K., Das, D., and Saikia, D. 2014. Photofermentative molecular biohydrogen production by purple-non-sulfur (PNS) bacteria in various modes: The present progress and future perspective. *Int J Hydrog Energy*. 39:6853–6871.
- Bharathiraja, B., Sudharsanaa, T., Bharghavi, A., Jayamuthunagai, J., and Praveenkumar, R. 2016. Biohydrogen and Biogas – An overview on feedstocks and enhancement process. *Fuel*. 185:810–828.
- Boran, E., Ozgur, E., Van Der Burg, J., Yucel, M., Gunduz, U., and Eroglu, I. 2010. Biological hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* in solar tubular photo bioreactor. *J Clean Prod*. 18:S29–S35.
- Boran, E., Özgür, E., Yücel, M., Gündüz, U., and Eroglu, I. 2012. Biohydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* Hup - mutant in pilot solar tubular photobioreactor. *Int J Hydrog Energy*. 37:16437–16445.
- Box, G.E.P., and Wilson, K.B. 1951. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *J R Stat Soc Ser B Methodol*. 13:1–45.
- Brena, B.M., and Batista-Viera, F. 2006. Immobilization of Enzymes. In: J.M. Guisan, ed. *Immobilization of Enzymes and Cells*. Totowa, NJ: Humana Press. pp. 15–30.
- Brentner, L.B., Peccia, J., and Zimmerman, J.B. 2010. Challenges in Developing Biohydrogen as a Sustainable Energy Source: Implications for a Research Agenda. *Environ Sci Technol*. 44:2243–2254.
- Bullough, P.A., Qian, P., and Hunter, C.N. 2009. Reaction Center-Light-Harvesting Core Complexes of Purple Bacteria. In: C.N. Hunter, F. Daldal, M.C. Thurnauer, and J.T. Beatty, eds. *The Purple Phototrophic Bacteria*. Springer Netherlands. pp. 155–179.
- Cai, J., Wang, G., and Pan, G. 2012. Hydrogen production from butyrate by a marine mixed phototrophic bacterial consort. *Int J Hydrog Energy*. 37:4057–4067.
- Cardeña, R. 2013. Efecto de las concentraciones de ácidos grasos volátiles sobre la producción de hidrógeno en un proceso fotofermentativo. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cardeña, R., Moreno, G., Valdez-Vazquez, I., and Buitrón, G. 2015. Optimization of volatile fatty acids concentration for photofermentative hydrogen production by a consortium. *Int J Hydrog Energy*. 40:17212–17223.
- Cardeña, R., Valdez-Vazquez, I., and Buitrón, G. 2017. Effect of volatile fatty acids mixtures on the simultaneous photofermentative production of hydrogen and polyhydroxybutyrate. *Bioprocess Biosyst Eng*. 40:231–239.

- Carlozzi, P., and Sacchi, A. 2001. Biomass production and studies on *Rhodospseudomonas palustris* grown in an outdoor, temperature controlled, underwater tubular photobioreactor. *J Biotechnol.* 88:239–249.
- Castillo, P., Magnin, J.-P., Velasquez, M., and Willison, J. 2012. Modeling And Optimization of Hydrogen Production By The Photosynthetic Bacterium *Rhodobacter capsulatus* By The Methodology Of Design Of Experiments (DOE): Interaction Between Lactate Concentration And Light Luminosity. *Energy Procedia.* 29:357–366.
- Cerrone, F., Duane, G., Casey, E., Davis, R., Belton, I., Kenny, S., Guzik, M., Woods, T., Babu, R., and O'Connor, K. 2014. Fed-batch strategies using butyrate for high cell density cultivation of *Pseudomonas putida* and its use as a biocatalyst. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98:9217–9228.
- Chandrasekhar, K., Lee, Y.-J., and Lee, D.-W. 2015. Biohydrogen Production: Strategies to Improve Process Efficiency through Microbial Routes. *Int J Mol Sci.* 16:8266–8293.
- Chen, C.-Y., and Chang, J.-S. 2006. Enhancing phototrophic hydrogen production by solid-carrier assisted fermentation and internal optical-fiber illumination. *Process Biochem.* 41:2041–2049.
- Chen, C.-Y., Lu, W.-B., Liu, C.-H., and Chang, J.-S. 2008a. Improved phototrophic H₂ production with *Rhodospseudomonas palustris* WP3-5 using acetate and butyrate as dual carbon substrates. *Bioresour Technol.* 99:3609–3616.
- Chen, C.-Y., Lu, W.-B., Wu, J.-F., and Chang, J.-S. 2007. Enhancing phototrophic hydrogen production of *Rhodospseudomonas palustris* via statistical experimental design. *Int J Hydrog Energy.* 32:940–949.
- Chen, C.-Y., Yang, M.-H., Yeh, K.-L., Liu, C.-H., and Chang, J.-S. 2008b. Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes. *Int J Hydrog Energy.* 33:4755–4762.
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Lo, Y.-C., Wang, H.-M., and Chang, J.-S. 2010. Engineering strategies for the enhanced photo-H₂ production using effluents of dark fermentation processes as substrate. *Int J Hydrog Energy.* 35:13356–13364.
- Chen, Q., Shi, Q., Gorb, S.N., and Li, Z. 2014. A multiscale study on the structural and mechanical properties of the luffa sponge from *Luffa cylindrica* plant. *J Biomech.* 47:1332–1339.
- Chen, X., Lv, Y., Liu, Y., Ren, R., and Zhao, J. 2017. The hydrogen production characteristics of mixed photoheterotrophic culture. *Int J Hydrog Energy.* 42:4840–4847.
- Chen, Y., Shen, J., Huang, L., Pan, Y., and Quan, X. 2016. Enhanced Cd(II) removal with simultaneous hydrogen production in biocathode microbial electrolysis cells in the presence of acetate or NaHCO₃. *Int J Hydrog Energy.* 41:13368–13379.
- Cogdell, R.J., Isaacs, N.W., Howard, T.D., McLuskey, K., Fraser, N.J., and Prince, S.M. 1999. How Photosynthetic Bacteria Harvest Solar Energy. *J Bacteriol.* 181:3869–3879.
- Cohen-Bazire, G., Sistrom, W.R., and Stanier, R.Y. 1957. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J Cell Comp Physiol.* 49:25–68.

- Das, D., and Veziroğlu, T.N. 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int J Hydrog Energy*. 26:13–28.
- Das, D., and Veziroglu, T.N. 2008. Advances in biological hydrogen production processes. *Int J Hydrog Energy*. 33:6046–6057.
- Dasgupta, C.N., Jose Gilbert, J., Lindblad, P., Heidorn, T., Borgvang, S.A., Skjanes, K., and Das, D. 2010. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. *Int J Hydrog Energy*. 35:10218–10238.
- Dilworth, M.J. 1966. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 127:285–294.
- Dincer, I., and Acar, C. 2015. Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability. *Int J Hydrog Energy*. 40:11094–11111.
- Ding, C., Yang, K.-L., and He, J. 2016. 11 - Biological and fermentative production of hydrogen. In: *Handbook of Biofuels Production (Second Edition)*. Woodhead Publishing. pp. 303–333.
- 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.
- Eady, R.R. 1996. Structure- function relationships of alternative nitrogenases. *Chem Rev*. 96:3013–3030.
- Eckersley, K., and Dow, C.S. 1980. *Rhodospseudomonas blastica* sp. nov.: a member of the Rhodospirillaceae. *Microbiology*. 119:465–473.
- Edgar, R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinforma Oxf Engl*. 26:2460–2461.
- Edgar, R.C. 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods*. 10:996–998.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., and Knight, R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinforma Oxf Engl*. 27:2194–2200.
- Elkahlout, K., Alipour, S., Eroglu, I., Gunduz, U., and Yucel, M. 2017. Long-term biological hydrogen production by agar immobilized *Rhodobacter capsulatus* in a sequential batch photobioreactor. *Bioprocess Biosyst Eng*. 40:589–599.
- Eroğlu, E., Eroğlu, İ., Gündüz, U., Türker, L., and Yücel, M. 2006. Biological hydrogen production from olive mill wastewater with two-stage processes. *Int J Hydrog Energy*. 31:1527–1535.
- Eroglu, E., Gunduz, U., Yucel, M., and Eroglu, I. 2010. Photosynthetic bacterial growth and productivity under continuous illumination or diurnal cycles with olive mill wastewater as feedstock. *Int J Hydrog Energy*. 35:5293–5300.
- Eroglu, E., Gunduz, U., Yucel, M., and Eroglu, I. 2011. Effect of iron and molybdenum addition on photofermentative hydrogen production from olive mill wastewater. *Int J Hydrog Energy*. 36:5895–5903.
- Eroglu, İ., Aslan, K., Gündüz, U., Yücel, M., and Türker, L. 1999. Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. *J Biotechnol*. 70:103–113.

- Eroğlu, İ., Tabanoğlu, A., Gündüz, U., Eroğlu, E., and Yücel, M. 2008. Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in a flat plate solar bioreactor. *Int J Hydrog Energy*. 33:531–541.
- Fang, H.H.P., Li, R.Y., and Zhang, T. 2011. Effects of Mo(VI) on phototrophic hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Environ Technol*. 32:1279–1285.
- Fang, H.H.P., Liu, H., and Zhang, T. 2005. Phototrophic hydrogen production from acetate and butyrate in wastewater. *Int J Hydrog Energy*. 30:785–793.
- Fedorov, A.S., Tsygankov, A.A., Rao, K.K., and Hall, D.O. 1998. Hydrogen photoproduction by *Rhodobacter sphaeroides* immobilised on polyurethane foam. *Biotechnol Lett*. 20:1007–1009.
- Felten, P. von, Zürrer, H., and Bachofen, R. 1985. Production of molecular hydrogen with immobilized cells of *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 23:15–20.
- Fißler, J., Schirra, C., Kohring, G.-W., and Giffhorn, F. 1994. Hydrogen production from aromatic acids by *Rhodopseudomonas palustris*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 41:395–399.
- Francou, N., and Vignais, P.M. 1984. Hydrogen production by *Rhodopseudomonas capsulata* cells entrapped in carrageenan beads. *Biotechnol Lett*. 6:639–644.
- Gabrielyan, L., Sargsyan, H., and Trchounian, A. 2015. Novel properties of photofermentative biohydrogen production by purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides*: effects of protonophores and inhibitors of responsible enzymes. *Microb Cell Factories*. 14.
- Gabrielyan, L., Torgomyan, H., and Trchounian, A. 2010. Growth characteristics and hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* using various amino acids as nitrogen sources and their combinations with carbon sources. *Int J Hydrog Energy*. 35:12201–12207.
- Gall, A., and Robert, B. 1999. Characterization of the different peripheral light-harvesting complexes from high- and low-light grown cells from *Rhodopseudomonas palustris*. *Biochemistry (Mosc)*. 38:5185–5190.
- Ghosh, D., Sobro, I.F., and Hallenbeck, P.C. 2012. Optimization of the hydrogen yield from single-stage photofermentation of glucose by *Rhodobacter capsulatus* JP91 using response surface methodology. *Bioresour Technol*. 123:199–206.
- Ghosh, S., Dairkee, U.K., Chowdhury, R., and Bhattacharya, P. 2017. Hydrogen from food processing wastes via photofermentation using Purple Non-sulfur Bacteria (PNSB) – A review. *Energy Convers Manag*. 141:299–314.
- Gorrell, T.E., and Uffen, R.L. 1977. Fermentative metabolism of pyruvate by *Rhodospirillum rubrum* after anaerobic growth in darkness. *J Bacteriol*. 131:533–543.
- Gosse, J.L., Engel, B.J., Hui, J.C.-H., Harwood, C.S., and Flickinger, M.C. 2010. Progress toward a biomimetic leaf: 4,000 h of hydrogen production by coating-stabilized nongrowing photosynthetic *Rhodopseudomonas palustris*. *Biotechnol Prog*. 26:907–918.

- Guimarães, J.L., Frollini, E., Silva, C.G. da, Wypych, F., and Satyanarayana, K.G. 2009. Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fibers of Brazil. *Ind Crops Prod.* 30:407–415.
- Guo, C.-L., Zhu, X., Liao, Q., Wang, Y.-Z., Chen, R., and Lee, D.-J. 2011. Enhancement of photo-hydrogen production in a biofilm photobioreactor using optical fiber with additional rough surface. *Bioresour Technol.* 102:8507–8513.
- HACH. 2002. *Water Analysis Handbook*. Colorado: HACH Company.
- Hakobyan, L., Gabrielyan, L., and Trchounian, A. 2013. The Effect of Various Metal Ions on Bio-hydrogen Production and F0F1-ATPase Activity of *Rhodobacter Sphaeroides*. SpringerLink. 165–177.
- Hallenbeck, P.C. 2009. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *Int J Hydrog Energy.* 34:7379–7389.
- Hallenbeck, P.C. 2013. Chapter 7 - Photofermentative Biohydrogen Production. In: A. Pandey, J.-S. Chang, P.C. Hallenbeck, and C. Larroche, eds. *Biohydrogen*. Amsterdam: Elsevier. pp. 145–159.
- Hallenbeck, P.C., Abo-Hashesh, M., and Ghosh, D. 2012. Strategies for improving biological hydrogen production. *Bioresour Technol.* 110:1–9.
- Hallenbeck, P.C., and Ghosh, D. 2009. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends Biotechnol.* 27:287–297.
- Hallenbeck, P.C., Meyer, C.M., and Vignais, P.M. 1982. Nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*: purification and molecular properties. *J Bacteriol.* 149:708–717.
- Han, H., Liu, B., Yang, H., and Shen, J. 2012. Effect of carbon sources on the photobiological production of hydrogen using *Rhodobacter sphaeroides* RV. *Int J Hydrog Energy.* 37:12167–12174.
- Hao, L., Zhang, B., Cheng, M., and Feng, C. 2016. Effects of various organic carbon sources on simultaneous V(V) reduction and bioelectricity generation in single chamber microbial fuel cells. *Bioresour Technol.* 201:105–110.
- Hay, J.X.W., Wu, T.Y., Juan, J.C., and Md. Jahim, J. 2013. Biohydrogen production through photo fermentation or dark fermentation using waste as a substrate: Overview, economics, and future prospects of hydrogen usage. *Biofuels Bioprod Biorefining.* 7:334–352.
- Hay, J.X.W., Wu, T.Y., Juan, J.C., and Md. Jahim, J. 2017. Effect of adding brewery wastewater to pulp and paper mill effluent to enhance the photofermentation process: wastewater characteristics, biohydrogen production, overall performance, and kinetic modeling. *Environ Sci Pollut Res.* 24:10354–10363.
- Hernández, G. 2011. *Producción de Hidrógeno en un Reactor con Biomasa Fija*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hillmer, P., and Gest, H. 1977. H₂ metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*: H₂ production by growing cultures. *J Bacteriol.* 129:724–731.
- Hiraishi, A., Muramatsu, K., and Urata, K. 1995. Characterization of new denitrifying *Rhodobacter* strains isolated from photosynthetic sludge for wastewater treatment. *J Ferment Bioeng.* 79:39–44.

- Hitit, Z.Y., Lazaro, C.Z., and Hallenbeck, P.C. 2017. Hydrogen production by co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Rhodospseudomonas palustris*: Optimization of yield using response surface methodology. *Int J Hydrog Energy*. 42:6578–6589.
- Hoogewerf, G.J., Jung, D.O., and Madigan, M.T. 2003. Evidence for limited species diversity of bacteriochlorophyll b-containing purple nonsulfur anoxygenic phototrophs in freshwater habitats. *FEMS Microbiol Lett*. 218:359–364.
- Hustede, E., Steinbüchel, A., and Schlegel, H.G. 1993. Relationship between the photoproduction of hydrogen and the accumulation of PHB in non-sulphur purple bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*. 39:87–93.
- Imhoff, J.F. 2008. Systematics of Anoxygenic Phototrophic Bacteria. In: *Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms*. Springer, Dordrecht. pp. 269–287.
- Jamil, Z., Mohamad Anuar, M.S., Ibrahim, S., and Vikineswary, S. 2009. Optimization of phototrophic hydrogen production by *Rhodospseudomonas palustris* PBUM001 via statistical experimental design. *Int J Hydrog Energy*. 34:7502–7512.
- Kao, P.-M., Hsu, B.-M., Tao, C.W., Hsu, T.-K., and Chang, C.-M. 2016. Control strategies for biohydrogen production by immobilized co-culture of *Clostridium butyricum* and *Rhodospseudomonas palustris*. *Int J Green Energy*. 13:977–982.
- Kars, G., Gündüz, U., Rakhely, G., Yücel, M., Eroğlu, İ., and Kovacs, K.L. 2008. Improved hydrogen production by uptake hydrogenase deficient mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *Int J Hydrog Energy*. 33:3056–3060.
- Kars, G., Gündüz, U., Yücel, M., Türker, L., and Eroglu, İ. 2006. Hydrogen production and transcriptional analysis of *nifD*, *nifK* and *hupS* genes in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 grown in media with different concentrations of molybdenum and iron. *Int J Hydrog Energy*. 31:1536–1544.
- Kawagoshi, Y., Oki, Y., Nakano, I., Fujimoto, A., and Takahashi, H. 2010. Biohydrogen production by isolated halotolerant photosynthetic bacteria using long-wavelength light-emitting diode (LW-LED). *Int J Hydrog Energy*. 35:13365–13369.
- Kayahan, E., Eroglu, I., and Koku, H. 2017. A compact tubular photobioreactor for outdoor hydrogen production from molasses. *Int J Hydrog Energy*. 42:2575–2582.
- Keskin, T., Abo-Hashesh, M., and Hallenbeck, P.C. 2011. Photofermentative hydrogen production from wastes. *Bioresour Technol*. 102:8557–8568.
- Keskin, T., Akboncuk, M.B., and Azbar, N. 2013. Biohydrogen production via a novel immobilized cell bioreactor. *Biofuels*. 4:595–603.
- Keskin, T., Giusti, L., and Azbar, N. 2012. Continuous biohydrogen production in immobilized biofilm system versus suspended cell culture. *Int J Hydrog Energy*. 37:1418–1424.
- Khan, Z.I., Ahmad, K., Ashraf, M., Parveen, R., Mustafa, I., Khan, A., Bibi, Z., and Akram, N.A. 2015. Bioaccumulation of heavy metals and metalloids in luffa (*Luffa cylindrica* L.) irrigated with domestic wastewater in Jhang, Pakistan: a prospect for human nutrition. *Pak J Bot*. 47:217–224.

- Kim, D.-H., Lee, J.-H., Kang, S., Hallenbeck, P.C., Kim, E.-J., Lee, J.K., and Kim, M.-S. 2014. Enhanced photo-fermentative H₂ production using *Rhodobacter sphaeroides* by ethanol addition and analysis of soluble microbial products. *Biotechnol Biofuels*. 7:79.
- Kim, E., Kim, J., Kim, M., and Lee, J. 2006a. Effect of changes in the level of light harvesting complexes of *Rhodobacter sphaeroides* on the photoheterotrophic production of hydrogen. *Int J Hydrog Energy*. 31:531–538.
- Kim, J.S., Ito, K., Izaki, K., and Takahashi, H. 1987. Production of Molecular Hydrogen by a Semi-continuous Outdoor Culture of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Agric Biol Chem*. 51:1173–1174.
- Kim, J.S., Ito, K., and Takahashi, H. 1980. The Relationship between Nitrogenase Activity and Hydrogen Evolution in *Rhodospseudomonas palustris*. *Agric Biol Chem*. 44:827–833.
- Kim, J.S., Ito, K., and Takahashi, H. 1982. Production of molecular hydrogen in outdoor batch cultures of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Agric Biol Chem*. 46:937–941.
- Kim, M.-S., Baek, J.-S., and Lee, J.K. 2006b. Comparison of accumulation by *Rhodobacter sphaeroides* KD131 and its uptake hydrogenase and PHB synthase deficient mutant. *Int J Hydrog Energy*. 31:121–127.
- Kim, M.-S., Kim, D.-H., and Cha, J. 2012. Culture conditions affecting H₂ production by phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* KD131. *Int J Hydrog Energy*. 37:14055–14061.
- Kim, M.-S., Kim, D.-H., Son, H.-N., Ten, L.N., and Lee, J.K. 2011. Enhancing photo-fermentative hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* KD131 and its PHB synthase deleted-mutant from acetate and butyrate. *Int J Hydrog Energy*. 36:13964–13971.
- Klasson, K.T., Lundbäck, K.M.O., Clausen, E.C., and Gaddy, J.L. 1993. Kinetics of light limited growth and biological hydrogen production from carbon monoxide and water by *Rhodospirillum rubrum*. *J Biotechnol*. 29:177–188.
- Klibanov, A.M. 1983. Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts.pdf. *Science*. 219:722–727.
- Koku, H., Eroğlu, İ., Gündüz, U., Yücel, M., and Türker, L. 2002. Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Int J Hydrog Energy*. 27:1315–1329.
- Koku, H., Eroğlu, İ., Gündüz, U., Yücel, M., and Türker, L. 2003. Kinetics of biological hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. *Int J Hydrog Energy*. 28:381–388.
- Kondo, T., Arakawa, M., Hirai, T., Wakayama, T., Hara, M., and Miyake, J. 2002. Enhancement of hydrogen production by a photosynthetic bacterium mutant with reduced pigment. *J Biosci Bioeng*. 93:145–150.
- Konorty, M., Brumfeld, V., Vermeaglio, A., Kahana, N., Medalia, O., and Minsky, A. 2009. Photosynthetic system in *Blastochloris viridis* revisited. *Biochemistry (Mosc)*. 48:4753–4761.
- Krahn, E., Schneider, K., and Müller, A. 1996. Comparative characterization of H₂ production by the conventional Mo nitrogenase and the alternative “iron-only”

- nitrogenase of *Rhodobacter capsulatus* hup- mutants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 46:285–290.
- Krujatz, F., Härtel, P., Helbig, K., Haufe, N., Thierfelder, S., Bley, T., and Weber, J. 2015. Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158 under intense irradiation. *Bioresour Technol.* 175:82–90.
- Kuo, F.-S., Chien, Y.-H., and Chen, C.-J. 2012. Effects of light sources on growth and carotenoid content of photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas palustris*. *Bioresour Technol.* 113:315–318.
- Lang, F.S., and Oesterhelt, D. 1989. Microaerophilic growth and induction of the photosynthetic reaction center in *Rhodospseudomonas viridis*. *J Bacteriol.* 171:2827–2834.
- Laocharoen, S., and Reungsang, A. 2014. Isolation, characterization and optimization of photo-hydrogen production conditions by newly isolated *Rhodobacter sphaeroides* KKU-PS5. *Int J Hydrog Energy.* 39:10870–10882.
- Larimer, F.W., Chain, P., Hauser, L., Lamerdin, J., Malfatti, S., Do, L., Land, M.L., Pelletier, D.A., Beatty, J.T., Lang, A.S., et al. 2004. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Nat Biotechnol.* 22:55–61.
- Laurinavichene, T.V., Belokopytov, B.F., Laurinavichius, K.S., Khusnutdinova, A.N., Seibert, M., and Tsygankov, A.A. 2012. Towards the integration of dark- and photo-fermentative waste treatment. 4. Repeated batch sequential dark- and photofermentation using starch as substrate. *Int J Hydrog Energy.* 37:8800–8810.
- Lazaro, C.Z., Varesche, M.B.A., and Silva, E.L. 2015. Effect of inoculum concentration, pH, light intensity and lighting regime on hydrogen production by phototrophic microbial consortium. *Renew Energy.* 75:1–7.
- Lazaro, C.Z., Vich, D.V., Hirasawa, J.S., and Varesche, M.B.A. 2012. Hydrogen production and consumption of organic acids by a phototrophic microbial consortium. *Int J Hydrog Energy.* 37:11691–11700.
- Lee, I.-H., Park, J., Kho, D., Kim, M.-S., and Lee, J. 2002. Reductive effect of H₂ uptake and poly- β -hydroxybutyrate formation on nitrogenase-mediated H₂ accumulation of *Rhodobacter sphaeroides* according to light intensity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60:147–153.
- Lehman, L.J., and Roberts, G.P. 1991. Identification of an alternative nitrogenase system in *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol.* 173:5705–5711.
- Levin, D.B., Pitt, L., and Love, M. 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int J Hydrog Energy.* 29:173–185.
- Levrresse, G., Cruzabeyr-Lopez, J., Trillita, J., Perez-Enriquez, R., Kotzarenko, A., and Carrillo-Chavez, A. 2015. Condiciones meteorológicas del Campus Juriquilla, UNAM, Querétaro.
- Li, R.Y., and Fang, H.H.P. 2008. Hydrogen production characteristics of photoheterotrophic *Rubrivivax gelatinosus* L31. *Int J Hydrog Energy.* 33:974–980.
- Li, R.Y., and Fang, H.H.P. 2009. Heterotrophic Photo Fermentative Hydrogen Production. *Crit Rev Environ Sci Technol.* 39:1081–1108.

- Li, R.Y., Zhang, T., and Fang, H.H.P. 2008. Characteristics of a phototrophic sludge producing hydrogen from acetate and butyrate. *Int J Hydrog Energy*. 33:2147–2155.
- Li, X., Wang, Y.-H., Zhang, S.-L., Chu, J., Zhang, M., Huang, M.-Z., and Zhuang, Y.-P. 2009. Enhancement of phototrophic hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* ZX-5 using a novel strategy — shaking and extra-light supplementation approach. *Int J Hydrog Energy*. 34:9677–9685.
- Liao, Q., Wang, Y.-J., Wang, Y.-Z., Zhu, X., Tian, X., and Li, J. 2010. Formation and hydrogen production of photosynthetic bacterial biofilm under various illumination conditions. *Bioresour Technol*. 101:5315–5324.
- Liu, B.-F., Jin, Y.-R., Cui, Q.-F., Xie, G.-J., Wu, Y.-N., and Ren, N.-Q. 2015. Photofermentation hydrogen production by *Rhodospseudomonas* sp. nov. strain A7 isolated from the sludge in a bioreactor. *Int J Hydrog Energy*. 40:8661–8668.
- Liu, B.-F., Ren, N.-Q., Xie, G.-J., Ding, J., Guo, W.-Q., and Xing, D.-F. 2010. Enhanced bio-hydrogen production by the combination of dark- and photofermentation in batch culture. *Bioresour Technol*. 101:5325–5329.
- Liu, B.-F., Ren, N.-Q., Xing, D.-F., Ding, J., Zheng, G.-X., Guo, W.-Q., Xu, J.-F., and Xie, G.-J. 2009. Hydrogen production by immobilized *R. faecalis* RLD-53 using soluble metabolites from ethanol fermentation bacteria *E. harbinense* B49. *Bioresour Technol*. 100:2719–2723.
- Liu, W., Yuan, L., and Wei, B. 2016. Study on improvement of continuous hydrogen production by photosynthetic biofilm in interior illuminant reactor. *J Environ Biol*. 37:999–1006.
- Lo, Y.-C., Chen, C.-Y., Lee, C.-M., and Chang, J.-S. 2011. Photo fermentative hydrogen production using dominant components (acetate, lactate, and butyrate) in dark fermentation effluents. *Int J Hydrog Energy*. 36:14059–14068.
- Loss, R.A., Fontes, M.L., Reginatto, V., and Antônio, R.V. 2013. Biohydrogen production by a mixed photoheterotrophic culture obtained from a Winogradsky column prepared from the sediment of a southern Brazilian lagoon. *Renew Energy*. 50:648–654.
- Lu, H., Zhang, G., Wan, T., and Lu, Y. 2011. Influences of light and oxygen conditions on photosynthetic bacteria macromolecule degradation: Different metabolic pathways. *Bioresour Technol*. 102:9503–9508.
- Madigan, M.T., and Jung, D.O. 2009. An Overview of Purple Bacteria: Systematics, Physiology, and Habitats. In: C.N. Hunter, F. Daldal, M.C. Thurnauer, and J.T. Beatty, eds. *The Purple Phototrophic Bacteria*. Springer Netherlands. pp. 1–15.
- Magdaong, N.C.M., Niedzwiedzki, D.M., Goodson, C., and Blankenship, R.E. 2016. Carotenoid-to-Bacteriochlorophyll Energy Transfer in the LH1-RC Core Complex of a Bacteriochlorophyll b Containing Purple Photosynthetic Bacterium *Blastochloris viridis*. *J Phys Chem B*. 120:5159–5171.
- Maness, P.-C., Huang, J., Smolinski, S., Tek, V., and Vanzin, G. 2005. Energy Generation from the CO Oxidation-Hydrogen Production Pathway in *Rubrivivax gelatinosus*. *Appl Environ Microbiol*. 71:2870–2874.

- Masepohl, B., Drepper, T., Paschen, A., Gross, S., Pawlowski, A., Raabe, K., Riedel, K.-U., and Klipp, W. 2002. Regulation of nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 4:243–248.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., and Fernandez-Lafuente, R. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol.* 40:1451–1463.
- Matsunaga, T., Hatano, T., Yamada, A., and Matsumoto, M. 2000. Microaerobic hydrogen production by photosynthetic bacteria in a double-phase photobioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 68:647–651.
- McKinlay, J.B., and Harwood, C.S. 2010a. Carbon dioxide fixation as a central redox cofactor recycling mechanism in bacteria. *Proc Natl Acad Sci.* 107:11669–11675.
- McKinlay, J.B., and Harwood, C.S. 2010b. Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel. *Curr Opin Biotechnol.* 21:244–251.
- McKinlay, J.B., Oda, Y., Rühl, M., Posto, A.L., Sauer, U., and Harwood, C.S. 2014. Non-growing *Rhodospseudomonas palustris* Increases the Hydrogen Gas Yield from Acetate by Shifting from the Glyoxylate Shunt to the Tricarboxylic Acid Cycle. *J Biol Chem.* 289:1960–1970.
- Merugu, R., Rudra, M.P.P., Nageshwari, B., Rao, A.S., and Ramesh, D. 2012. Photoproduction of Hydrogen under Different Cultural Conditions by Alginate Immobilized *Rhodospseudomonas palustris* KU003. *ISRN Renew Energy.* 2012:1–5.
- Meyer, J., Kelley, B.C., and Vignais, P.M. 1978. Effect of light nitrogenase function and synthesis in *Rhodospseudomonas capsulata*. *J Bacteriol.* 136:201–208.
- Mirza, S.S., Qazi, J.I., Zhao, Q., and Chen, S. 2013. Photo-biohydrogen production potential of *Rhodobacter capsulatus*- PK from wheat straw. *Biotechnol Biofuels.* 6:144.
- Miyake, J., Wakayama, T., Schnackenberg, J., Arai, T., and Asada, Y. 1999. Simulation of the daily sunlight illumination pattern for bacterial photo-hydrogen production. *J Biosci Bioeng.* 88:659–663.
- Montiel Corona, V., Le Borgne, S., Revah, S., and Morales, M. 2017. Effect of light-dark cycles on hydrogen and poly- β -hydroxybutyrate production by a photoheterotrophic culture and *Rhodobacter capsulatus* using a dark fermentation effluent as substrate. *Bioresour Technol.* 226:238–246.
- Montiel-Corona, V., Revah, S., and Morales, M. 2015. Hydrogen production by an enriched photoheterotrophic culture using dark fermentation effluent as substrate: Effect of flushing method, bicarbonate addition, and outdoor–indoor conditions. *Int J Hydrog Energy.* 40:9096–9105.
- Morsy, F.M. 2017. Synergistic dark and photo-fermentation continuous system for hydrogen production from molasses by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710. *J Photochem Photobiol B.* 169:1–6.

- Mu, Y., Wang, G., and Yu, H.-Q. 2006. Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures. *Bioresour Technol.* 97:1302–1307.
- Nasr, M., Tawfik, A., Ookawara, S., Suzuki, M., Kumari, S., and Bux, F. 2015. Continuous biohydrogen production from starch wastewater via sequential dark-photo fermentation with emphasize on maghemite nanoparticles. *J Ind Eng Chem.* 21:500–506.
- Nath, K., and Das, D. 2009. Effect of light intensity and initial pH during hydrogen production by an integrated dark and photofermentation process. *Int J Hydrog Energy.* 34:7497–7501.
- Niel, C.B. van. 1944. The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriol Rev.* 8:1–118.
- Nuyanzina-Boldareva, E., Kalashnikov, A., Gaisin, V., Sukhacheva, M., Kuznetsov, B., and Gorlenko, V. 2014. Characterization of a new strain of a purple nonsulfur bacterium from a thermal spring. *Microbiol 00262617.* 83:39–46.
- Oboh, I.O., Aluyor, E.O., and Audu, T.O.K. 2011. Application of *Luffa Cylindrica* in Natural form as Biosorbent to Removal of Divalent Metals from Aqueous Solutions - Kinetic and Equilibrium Study.
- Oda, Y., Samanta, S.K., Rey, F.E., Wu, L., Liu, X., Yan, T., Zhou, J., and Harwood, C.S. 2005. Functional Genomic Analysis of Three Nitrogenase Isozymes in the Photosynthetic Bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *J Bacteriol.* 187:7784–7794.
- Oh, E.K., Kim, E.-J., Hwang, H.-J., Tong, X., Nam, J.-M., Kim, M.-S., and Lee, J.K. 2012. The photoheterotrophic H₂ evolution of *Rhodobacter sphaeroides* is enhanced in the presence of ethanol. *Int J Hydrog Energy.* 37:15886–15892.
- Oh, Y.-K., Kim, Y.-J., Park, J.-Y., Lee, T.H., Kim, M.-S., and Park, S. 2005. Biohydrogen production from carbon monoxide and water by *Rhodospseudomonas palustris* P4. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 10:270–274.
- Oh, Y.-K., Raj, S.M., Jung, G.Y., and Park, S. 2011. Current status of the metabolic engineering of microorganisms for biohydrogen production. *Bioresour Technol.* 102:8357–8367.
- Oh, Y.-K., Seol, E.-H., Kim, M.-S., and Park, S. 2004. Photoproduction of hydrogen from acetate by a chemoheterotrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* P4. *Int J Hydrog Energy.* 29:1115–1121.
- Ooshima, H., Takakuwa, S., Katsuda, T., Okuda, M., Shirasawa, T., Azuma, M., and Kato, J. 1998. Production of hydrogen by a hydrogenase-deficient mutant of *Rhodobacter capsulatus*. *J Ferment Bioeng.* 85:470–475.
- Özgür, E., and Peksel, B. 2013. Biohydrogen production from barley straw hydrolysate through sequential dark and photofermentation. *J Clean Prod.* 52:14–20.
- Özkan, E., Uyar, B., Özgür, E., Yücel, M., Eroglu, I., and Gündüz, U. 2012. Photofermentative hydrogen production using dark fermentation effluent of sugar beet thick juice in outdoor conditions. *Int J Hydrog Energy.* 37:2044–2049.

- Ozmihci, S., and Kargi, F. 2010. Bio-hydrogen production by photo-fermentation of dark fermentation effluent with intermittent feeding and effluent removal. *Int J Hydrog Energy*. 35:6674–6680.
- Padovani, G., Vaičiulytė, S., and Carozzi, P. 2016. BioH₂ photoproduction by means of *Rhodospseudomonas palustris* sp. cultured in a lab-scale photobioreactor operated in batch, fed-batch and semi-continuous modes. *Fuel*. 166:203–210.
- Pakpour, F., Najafpour, G., Tabatabaei, M., Tohidfar, M., and Younesi, H. 2014. Biohydrogen production from CO-rich syngas via a locally isolated *Rhodospseudomonas palustris* PT. *Bioprocess Biosyst Eng*. 37:923–930.
- Patel, S.K.S., Purohit, H.J., and Kalia, V.C. 2010. Dark fermentative hydrogen production by defined mixed microbial cultures immobilized on ligno-cellulosic waste materials. *Int J Hydrog Energy*. 35:10674–10681.
- Pechter, K.B., Gallagher, L., Pyles, H., Manoil, C.S., and Harwood, C.S. 2016. Essential Genome of the Metabolically Versatile Alphaproteobacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *J Bacteriol*. 198:867–876.
- Petushkova, E.P., and Tsygankov, A.A. 2017. Acetate metabolism in the purple non-sulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem Mosc*. 82:587–605.
- Phadtare, S. 2004. Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr Issues Mol Biol*. 6:125–136.
- Pintucci, C., Giovannelli, A., Traversi, M.L., Ena, A., Padovani, G., and Carozzi, P. 2013. Fresh olive mill waste deprived of polyphenols as feedstock for hydrogen photo-production by means of *Rhodospseudomonas palustris* 42OL. *Renew Energy*. 51:358–363.
- Planchard, A., Mignot, L., Jouenne, T., and Junter, G.-A. 1989. Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum* immobilized in composite agar layer/microporous membrane structures. *Appl Microbiol Biotechnol*. 31:49–54.
- Rai, P.K., and Singh, S.P. 2016. Integrated dark- and photo-fermentation: Recent advances and provisions for improvement. *Int J Hydrog Energy*. 41:19957–19971.
- Rai, P.K., Singh, S.P., and Asthana, R.K. 2011. Biohydrogen Production from Cheese Whey Wastewater in a Two-Step Anaerobic Process. *Appl Biochem Biotechnol*. 167:1540–1549.
- Rao, K.K., and Hall, D.O. 1984. Photosynthetic production of fuels and chemicals in immobilized systems. *Trends Biotechnol*. 2:124–129.
- Ren, N.-Q., Liu, B.-F., Ding, J., and Xie, G.-J. 2009a. Hydrogen production with *R. faecalis* RLD-53 isolated from freshwater pond sludge. *Bioresour Technol*. 100:484–487.
- Ren, N.-Q., Liu, B.-F., Zheng, G.-X., Xing, D.-F., Zhao, X., Guo, W.-Q., and Ding, J. 2009b. Strategy for enhancing photo-hydrogen production yield by repeated fed-batch cultures. *Int J Hydrog Energy*. 34:7579–7584.
- Ritchie, R.J. 2013. The Use of Solar Radiation by the Photosynthetic Bacterium, *Rhodospseudomonas palustris*: Model Simulation of Conditions Found in a Shallow Pond or a Flatbed Reactor. *Photochem Photobiol*. 89:1143–1162.

- Ruiz, V., Ilhan, Z.E., Kang, D.-W., Krajmalnik-Brown, R., and Buitrón, G. 2014. The source of inoculum plays a defining role in the development of MEC microbial consortia fed with acetic and propionic acid mixtures. *J Biotechnol.* 182–183:11–18.
- Sakurai, H., Masukawa, H., Kitashima, M., and Inoue, K. 2013. Photobiological hydrogen production: Bioenergetics and challenges for its practical application. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev.* 17:1–25.
- Sarmiento, F.B., Leigh, J.A., and Whitman, W.B. 2011. Genetic Systems for Hydrogenotrophic Methanogens. *Methods Enzymol.* 494:43–73.
- Sasikala, C., and Ramana, C.V. 1997. Biodegradation and Metabolism of Unusual Carbon Compounds by Anoxygenic Phototrophic Bacteria. In: R.K. Poole, ed. *Advances in Microbial Physiology.* Academic Press. pp. 339–377.
- Sasikala, C.H., Ramana, C.H.V., and Rao, P.R. 1995. Regulation of simultaneous hydrogen photoproduction during growth by pH and glutamate in *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. *Int J Hydrog Energy.* 20:123–126.
- Sasikala, K., Ramana, C.V., Raghuvver Rao, P., and Subrahmanyam, M. 1990. Photoproduction of hydrogen, nitrogenase and hydrogenase activities of free and immobilized whole cells of *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. *FEMS Microbiol Lett.* 72:23–28.
- Sasikala, K., Ramana, C.V., Rao, P.R., and Kovacs, K.L. 1993. Anoxygenic Phototrophic Bacteria: Physiology and Advances in Hydrogen Production Technology. In: S.N. and A.I. Laskin, ed. *Advances in Applied Microbiology.* Academic Press. pp. 211–295.
- Schultz, J.E., and Weaver, P.F. 1982. Fermentation and Anaerobic Respiration by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*. *J Bacteriol.* 149:181–190.
- Seifert, K., Waligorska, M., and Laniecki, M. 2010. Hydrogen generation in photobiological process from dairy wastewater. *Int J Hydrog Energy.* 35:9624–9629.
- Sharma, S., and Ghoshal, S.K. 2015. Hydrogen the future transportation fuel: From production to applications. *Renew Sustain Energy Rev.* 43:1151–1158.
- Shi, X.-Y., and Yu, H.-Q. 2005. Response surface analysis on the effect of cell concentration and light intensity on hydrogen production by *Rhodopseudomonas capsulata*. *Process Biochem.* 40:2475–2481.
- Shi, X.-Y., and Yu, H.-Q. 2006. Continuous production of hydrogen from mixed volatile fatty acids with *Rhodopseudomonas capsulata*. *Int J Hydrog Energy.* 31:1641–1647.
- Show, K.Y., Lee, D.J., Tay, J.H., Lin, C.Y., and Chang, J.S. 2012. Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. *Int J Hydrog Energy.* 37:15616–15631.
- Siegert, M., Li, X.-F., Yates, M.D., and Logan, B.E. 2015. The presence of hydrogenotrophic methanogens in the inoculum improves methane gas production in microbial electrolysis cells. *Front Microbiol.* 5.
- Siemann, S., Schneider, K., Dröttboom, M., and Müller, A. 2002. The Fe-only nitrogenase and the Mo nitrogenase from *Rhodobacter capsulatus*: a

- comparative study on the redox properties of the metal clusters present in the dinitrogenase components. *Eur J Biochem.* 269:1650–1661.
- Sturgis, J.N., and Niederman, R.A. 2009. Organization and Assembly of Light-Harvesting Complexes in the Purple Bacterial Membrane. In: C.N. Hunter, F. Daldal, M.C. Thurnauer, and J.T. Beatty, eds. *The Purple Phototrophic Bacteria*. Springer Netherlands. pp. 253–273.
- Su, H., Cheng, J., Zhou, J., Song, W., and Cen, K. 2009. Combination of dark- and photo-fermentation to enhance hydrogen production and energy conversion efficiency. *Int J Hydrog Energy.* 34:8846–8853.
- Subudhi, S., Mogal, S.K., Ram Kumar, N., Nayak, T., Lal, B., Velankar, H., Rajiv Kumar, T.A., Rao, P.V.C., Choudary, N.V., Shah, G., et al. 2016. Photo fermentative hydrogen production by a new strain; *Rhodobacter sphaeroides* CNT 2A, isolated from pond sediment. *Int J Hydrog Energy.* 41:13979–13985.
- Sweet, W.J., and Burris, R.H. 1981. Inhibition of nitrogenase activity by NH_4^+ in *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol.* 145:824–831.
- Takagi, D., Okamura, S., Tanaka, K., Ikenaga, N., Iwashima, M., Haghparast, S.M.A., Tanaka, N., and Miyake, J. 2016. Characterization of hydrogen production by the co-culture of dark-fermentative and photosynthetic bacteria. *Res Chem Intermed.* 42:7713–7722.
- Talbot, M.J., and White, R.G. 2013. Methanol fixation of plant tissue for Scanning Electron Microscopy improves preservation of tissue morphology and dimensions. *Plant Methods.* 9:36.
- Tao, Y., Chen, Y., Wu, Y., He, Y., and Zhou, Z. 2007. High hydrogen yield from a two-step process of dark- and photo-fermentation of sucrose. *Int J Hydrog Energy.* 32:200–206.
- Tao, Y., He, Y., Wu, Y., Liu, F., Li, X., Zong, W., and Zhou, Z. 2008. Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment. *Int J Hydrog Energy.* 33:963–973.
- Tawfik, A., El-Bery, H., Kumari, S., and Bux, F. 2014. Use of mixed culture bacteria for photofermentive hydrogen of dark fermentation effluent. *Bioresour Technol.* 168:119–126.
- Tekucheva, D.N., Laurinavichene, T.V., Seibert, M., and Tsygankov, A.A. 2011. Immobilized purple bacteria for light-driven H_2 production from starch and potato fermentation effluents. *Biotechnol Prog.* 27:1248–1256.
- Tian, X., Liao, Q., Liu, W., Wang, Y.Z., Zhu, X., Li, J., and Wang, H. 2009. Photo-hydrogen production rate of a PVA-boric acid gel granule containing immobilized photosynthetic bacteria cells. *Int J Hydrog Energy.* 34:4708–4717.
- Tian, X., Liao, Q., Zhu, X., Wang, Y., Zhang, P., Li, J., and Wang, H. 2010. Characteristics of a biofilm photobioreactor as applied to photo-hydrogen production. *Bioresour Technol.* 101:977–983.
- Tsygankov, A., and Kosourov, S. 2014. Immobilization of Photosynthetic Microorganisms for Efficient Hydrogen Production. In: *Microbial BioEnergy: Hydrogen Production*. Springer, Dordrecht. pp. 321–347.

- Tsygankov, A.A., Fedorov, A.S., Laurinavichene, T.V., Gogotov, I.N., Rao, K.K., and Hall, D.O. 1998. Actual and potential rates of hydrogen photoproduction by continuous culture of the purple non-sulphur bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 49:102–107.
- Tsygankov, A.A., Hirata, Y., Miyake, M., Asada, Y., and Miyake, J. 1994. Photobioreactor with photosynthetic bacteria immobilized on porous glass for hydrogen photoproduction. *J Ferment Bioeng.* 77:575–578.
- Tsygankov, A.S., Serebryakova, L.T., Sveshnikov, D.A., Rao, K.K., Gogotov, I.N., and Hall, D.O. 1997. Hydrogen photoproduction by three different nitrogenases in whole cells of *Anabaena variabilis* and the dependence on pH. *Int J Hydrog Energy.* 22:859–867.
- Uyar, B., Eroglu, I., Yücel, M., Gündüz, U., and Türker, L. 2007. Effect of light intensity, wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors. *Int J Hydrog Energy.* 32:4670–4677.
- Valdez-Vazquez, I., Morales, A.L., and Escalante, A.E. 2017. History of adaptation determines short-term shifts in performance and community structure of hydrogen-producing microbial communities degrading wheat straw. *Microb Biotechnol.*
- Venkateswar Reddy, M., Mawatari, Y., Onodera, R., Nakamura, Y., Yajima, Y., and Chang, Y.-C. 2017. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from synthetic waste using *Pseudomonas pseudoflava*: PHA synthase enzyme activity analysis from *P. pseudoflava* and *P. palleronii*. *Bioresour Technol.* 234:99–105.
- Vignais, P.M., Colbeau, A., Willison, J.C., and Jouanneau, Y. 1985. Hydrogenase, Nitrogenase, and Hydrogen Metabolism in the Photosynthetic Bacteria. In: A.H.R. and D.W. Tempest, ed. *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press. pp. 155–234.
- Villa-Leyva, A. 2015. Optimización heurística de un fermentador productor de hidrógeno modificando la carga orgánica. Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Wakayama, T., Nakada, E., Asada, Y., and Miyake, J. 2000. Effect of light/dark cycle on bacterial hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* RV. *Appl Biochem Biotechnol.* 84–86:431–440.
- Wang, D., Zhang, Y., Welch, E., Li, J., and Roberts, G.P. 2010a. Elimination of Rubisco alters the regulation of nitrogenase activity and increases hydrogen production in *Rhodospirillum rubrum*. *Int J Hydrog Energy.* 35:7377–7385.
- Wang, J., and Wan, W. 2009a. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. *Int J Hydrog Energy.* 34:235–244.
- Wang, J., and Wan, W. 2009b. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Int J Hydrog Energy.* 34:799–811.
- Wang, R., Cui, C., Jin, Y., Liu, B., Xing, D., Xie, G., and Ren, N. 2014a. Photo-fermentative hydrogen production from mixed substrate by mixed bacteria. *Int J Hydrog Energy.* 39:13396–13400.

- Wang, X., Yang, H., Zhang, Y., and Guo, L. 2014b. Remarkable enhancement on hydrogen production performance of *Rhodobacter sphaeroides* by disrupting *spbA* and *hupSL* genes. *Int J Hydrog Energy*. 39:14633–14641.
- Wang, Y., Zhou, P., Tong, J., and Gao, R. 2016. Advances in the genetic modification of *Rhodobacter sphaeroides* to improve hydrogen production. *Renew Sustain Energy Rev*. 60:1312–1318.
- Wang, Y.-Z., Liao, Q., Zhu, X., Chen, R., Guo, C.-L., and Zhou, J. 2013. Bioconversion characteristics of *Rhodospseudomonas palustris* CQK 01 entrapped in a photobioreactor for hydrogen production. *Bioresour Technol*. 135:331–338.
- Wang, Y.-Z., Liao, Q., Zhu, X., Tian, X., and Zhang, C. 2010b. Characteristics of hydrogen production and substrate consumption of *Rhodospseudomonas palustris* CQK 01 in an immobilized-cell photobioreactor. *Bioresour Technol*. 101:4034–4041.
- Wen, S., Liu, H., He, H., Luo, L., Li, X., Zeng, G., Zhou, Z., Lou, W., and Yang, C. 2016. Treatment of anaerobically digested swine wastewater by *Rhodobacter blasticus* and *Rhodobacter capsulatus*. *Bioresour Technol*. 222:33–38.
- Willows, R.D., and Kriegel, A.M. 2009. Biosynthesis of Bacteriochlorophylls in Purple Bacteria. In: C.N. Hunter, F. Daldal, M.C. Thurnauer, and J.T. Beatty, eds. *The Purple Phototrophic Bacteria*. Springer Netherlands. pp. 57–79.
- Winter, C.-J. 2009. Hydrogen energy — Abundant, efficient, clean: A debate over the energy-system-of-change☆. *Int J Hydrog Energy*. 34:S1–S52.
- Won, S.G., and Lau, A.K. 2011. Effects of key operational parameters on biohydrogen production via anaerobic fermentation in a sequencing batch reactor. *Bioresour Technol*. 102:6876–6883.
- World Energy Council. 2016. *World-Energy-Resources_Report_2016.pdf*.
- Wu, S.C., Liou, S.Z., and Lee, C.M. 2012. Correlation between bio-hydrogen production and polyhydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Rhodospseudomonas palustris* WP3-5. *Bioresour Technol*. 113:44–50.
- Wu, X., Wang, X., Yang, H., and Guo, L. 2010. A comparison of hydrogen production among three photosynthetic bacterial strains. *Int J Hydrog Energy*. 35:7194–7199.
- Wu, X.-M., Zhu, L.-Y., Zhu, L.-Y., and Wu, L. 2016a. Improved ammonium tolerance and hydrogen production in *nifA* mutant strains of *Rhodospseudomonas palustris*. *Int J Hydrog Energy*. 41:22824–22830.
- Wu, Y.-N., Wen, H.-Q., Zhu, J.-N., Ding, J., Ren, N.-Q., and Liu, B.-F. 2016b. Best mode for photo-fermentation hydrogen production: The semi-continuous operation. *Int J Hydrog Energy*. 41:16048–16054.
- Xie, G.-J., Liu, B.-F., Ding, J., Xing, D.-F., Ren, H.-Y., Guo, W.-Q., and Ren, N.-Q. 2012a. Enhanced photo-H₂ production by *Rhodospseudomonas faecalis* RLD-53 immobilization on activated carbon fibers. *Biomass Bioenergy*. 44:122–129.
- Xie, G.-J., Liu, B.-F., Ren, H.-Y., Xing, D.-F., Nan, J., and Ren, N.-Q. 2014. Material flow analysis of feedstock for enhancing its conversion efficiency during continuous photo-hydrogen production. *GCB Bioenergy*. 6:621–628.

- Xie, G.-J., Liu, B.-F., Wang, R.-Q., Ding, J., Ren, H.-Y., Zhou, X., and Ren, N.-Q. 2015. Bioaggregate of photo-fermentative bacteria for enhancing continuous hydrogen production in a sequencing batch photobioreactor. *Sci Rep.* 5.
- Xie, G.-J., Liu, B.-F., Wen, H.-Q., Li, Q., Yang, C.-Y., Han, W.-L., Nan, J., and Ren, N.-Q. 2013. Bioflocculation of photo-fermentative bacteria induced by calcium ion for enhancing hydrogen production. *Int J Hydrog Energy.* 38:7780–7788.
- Xie, G.-J., Liu, B.-F., Xing, D.-F., Nan, J., Ding, J., Ren, H.-Y., Guo, W.-Q., and Ren, N.-Q. 2012b. Photo-hydrogen production by *Rhodospseudomonas faecalis* RLD-53 immobilized on the surface of modified activated carbon fibers. *RSC Adv.* 2:2225–2228.
- Yang, H., Wang, X., Zhang, L., and Guo, L. 2012. Enhanced hydrogen production performance of *Rubrivivax gelatinosus* M002 using mixed carbon sources. *Int J Hydrog Energy.* 37:13296–13303.
- Yang, H., Zhang, J., Wang, X., Feng, J., Yan, W., and Guo, L. 2015. Coexpression of Mo- and Fe-nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* enhanced its photosynthetic hydrogen production. *Int J Hydrog Energy.* 40:927–934.
- Yetis, M., Gündüz, U., Eroglu, I., Yücel, M., and Türker, L. 2000. Photoproduction of hydrogen from sugar refinery wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* OU 001. *Int J Hydrog Energy.* 25:1035–1041.
- Yiğit, D.Ö., Gündüz, U., Türker, L., Yücel, M., and Eroğlu, İ. 1999. Identification of by-products in hydrogen producing bacteria; *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 grown in the waste water of a sugar refinery. *J Biotechnol.* 70:125–131.
- Yilmaz, L.S., Kontur, W.S., Sanders, A.P., Sohmen, U., Donohue, T.J., and Noguera, D.R. 2010. Electron Partitioning During Light- and Nutrient-Powered Hydrogen Production by *Rhodobacter sphaeroides*. *BioEnergy Res.* 3:55–66.
- Ying, Y., Lv, Z., Min, H., and Cheng, J. 2008. Dynamic changes of microbial community diversity in a photohydrogen producing reactor monitored by PCR-DGGE. *J Environ Sci.* 20:1118–1125.
- Zagrodnik, R., and Laniecki, M. 2015. The role of pH control on biohydrogen production by single stage hybrid dark- and photo-fermentation. *Bioresour Technol.* 194:187–195.
- Zagrodnik, R., Seifert, K., Stodolny, M., and Laniecki, M. 2015. Continuous photofermentative production of hydrogen by immobilized *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *Int J Hydrog Energy.* 40:5062–5073.
- Zagrodnik, R., Thiel, M., Seifert, K., Włodarczak, M., and Łaniecki, M. 2013. Application of immobilized *Rhodobacter sphaeroides* bacteria in hydrogen generation process under semi-continuous conditions. *Int J Hydrog Energy.* 38:7632–7639.
- Zhang, C., Zhang, H., Zhang, Z., Jiao, Y., and Zhang, Q. 2014. Effects of mass transfer and light intensity on substrate biological degradation by immobilized photosynthetic bacteria within an annular fiber-illuminating biofilm reactor. *J Photochem Photobiol B.* 131:113–119.
- Zhang, C., Zhu, X., Liao, Q., Wang, Y., Li, J., Ding, Y., and Wang, H. 2010. Performance of a groove-type photobioreactor for hydrogen production by immobilized photosynthetic bacteria. *Int J Hydrog Energy.* 35:5284–5292.

- Zhang, Z., Wang, Y., Hu, J., Wu, Q., and Zhang, Q. 2015. Influence of mixing method and hydraulic retention time on hydrogen production through photo-fermentation with mixed strains. *Int J Hydrog Energy*. 40:6521–6529.
- Zheng, G., Kang, Z., Qian, Y., and Wang, L. 2009. Enhanced biohydrogen generation from organic wastewater containing NH_4^+ by phototrophic bacteria *Rhodobacter sphaeroides* AR-3. *Front Environ Sci Eng China*. 3:387.
- Zhou, Q., Zhang, P., and Zhang, G. 2014. Biomass and carotenoid production in photosynthetic bacteria wastewater treatment: Effects of light intensity. *Bioresour Technol*. 171:330–335.
- Zhu, H., Suzuki, T., Tsygankov, A.A., Asada, Y., and Miyake, J. 1999a. Hydrogen production from tofu wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* immobilized in agar gels. *Int J Hydrog Energy*. 24:305–310.
- Zhu, H., Wakayama, T., Suzuki, T., Asada, Y., and Miyake, J. 1999b. Entrapment of *Rhodobacter sphaeroides* RV in cationic polymer/agar gels for hydrogen production in the presence of NH_4^+ . *J Biosci Bioeng*. 88:507–512.
- Zumft, W.G., and Castillo, F. 1978. Regulatory properties of the nitrogenase from *Rhodospseudomonas palustris*. *Arch Microbiol*. 117:53–60.

Anexos

A.1. ANOVAs para evaluar el efecto del tipo de iluminación sobre $H_{\text{máx}}$ y ΔDQO

A.1.1. ANOVA para $H_{\text{máx}}$ en función del tipo de iluminación

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Media de cuadrados	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9.69×10^6	2	4.85×10^6	277.53	0.0004
Intra grupos	5.24×10^4	3	1.75×10^4		
Total	9.74×10^6	5			

GI. Grados de libertad

A.1.2. ANOVA para ΔDQO en función del tipo de iluminación

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Media de cuadrados	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	484.33	2	242.17	7.09	0.0730
Intra grupos	102.5	3	34.17		
Total	586.83	5			

A.2. ANOVAs para evaluar el efecto del pH inicial y la intensidad luminosa en $H_{\text{máx}}$, $R_{\text{máx}}$ y ΔDQO

A.2.1. ANOVA para $H_{\text{máx}}$ en función del pH y la intensidad luminosa

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Media de cuadrados	Razón-F	Valor-P
X_1	1.80×10^6	1	1.80×10^6	13.53	0.0212
X_1^2	5.42×10^5	1	5.42×10^5	4.07	0.1137
X_2	6.91×10^4	1	6.91×10^4	0.52	0.5109
X_2^2	2.54×10^6	1	2.54×10^6	19.13	0.0119
X_1X_2	6.60×10^4	1	6.60×10^4	0.50	0.5199
Error	5.32×10^5	4	1.33×10^5		
Total	5.0×10^6	9			

X_1 , pH inicial y X_2 , intensidad luminosa.

A.2.2. ANOVA para $R_{\text{máx}}$ en función del pH y la intensidad luminosa

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Media de cuadrados	Razón-F	Valor-P
X_1	21.60	1	21.60	10.25	0.0329
X_1^2	139.23	1	139.23	66.07	0.0012
X_2	23.68	1	23.68	11.24	0.0285
X_2^2	14.71	1	14.71	6.98	0.0575
X_1X_2	0.49	1	0.49	0.23	0.6549
Error	8.43	4	2.11		
Total	195.26	9			

A.2.3. ANOVA para ΔDQO en función del pH y la intensidad luminosa

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Media de cuadrados	Razón-F	Valor-P
X_1	364.58	1	364.58	29.82	0.0055
X_1^2	131.46	1	131.46	10.75	0.0305
X_2	4.85	1	4.85	0.40	0.5632
X_2^2	114.86	1	114.86	9.39	0.0375
X_1X_2	9.61	1	9.61	0.79	0.4254
Error	48.91	4	12.23		
Total	600.66	9			

A.3. ANOVAs para evaluar el efecto de la concentración de Fe, Mo y V sobre $H_{\text{máx}}$, $R_{\text{máx}}$, λ , ΔDQO y actividad nitrogenasa

A.3.1. ANOVA para $H_{\text{máx}}$ en función de la concentración de Fe, Mo y V

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Media de cuadrados	Razón-F	Valor-P
X_1	1.58×10^6	1	1.58×10^6	19.89	0.0029
X_2	6.66×10^5	1	6.66×10^5	8.41	0.0230
X_3	2.81×10^4	1	2.81×10^4	0.35	0.5704
X_1^2	5.54×10^5	1	5.54×10^5	7.00	0.0331
X_1X_2	1.23×10^5	1	1.23×10^5	1.56	0.2523
X_1X_3	7.79×10^4	1	7.79×10^4	0.98	0.3543
X_2^2	2.32×10^5	1	2.32×10^5	2.92	0.1310
X_2X_3	5.96×10^4	1	5.96×10^4	0.75	0.4143
X_3^2	4582.77	1	4582.77	0.06	0.8168
Error total	5.54×10^5	7	7.92×10^4		
Total	5.07×10^6	16			

X_1 , concentración de Fe, X_2 , concentración de Mo y X_3 , concentración de V

A.3.2. ANOVA para $R_{\text{máx}}$ en función de la concentración de Fe, Mo y V

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Media de cuadrados	Razón-F	Valor-P
X_1	59.96	1	59.98	11.14	0.0125
X_2	30.29	1	30.29	5.63	0.0495
X_3	3.70	1	3.70	0.69	0.4344
X_1^2	140.29	1	140.29	26.06	0.0014
X_1X_2	10.05	1	10.05	1.87	0.2140
X_1X_3	5.79	1	5.79	1.08	0.3342
X_2^2	7.18	1	7.18	1.33	0.2860
X_2X_3	0.18	1	0.18	0.03	0.8611
X_3^2	0.48	1	0.48	0.09	0.7745
Error total	37.68	7	5.38		
Total	421.37	16			

A.3.3. ANOVA para λ en función de la concentración de Fe, Mo y V

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Media de cuadrados	Razón-F	Valor-P
X ₁	13.46	1	13.46	0.36	0.5676
X ₂	0.86	1	0.86	0.02	0.8837
X ₃	16.32	1	16.32	0.44	0.5303
X ₁ ²	151.10	1	151.10	4.03	0.0845
X ₁ X ₂	8.80	1	8.80	0.23	0.6427
X ₁ X ₃	7.10	1	7.10	0.19	0.6764
X ₂ ²	15.21	1	15.21	0.41	0.5441
X ₂ X ₃	49.51	1	49.51	1.32	0.2880
X ₃ ²	10.62	1	10.62	0.28	0.6108
Error total	262.13	7	37.447		
Total	652.64	16			

A.3.4. ANOVA para Δ DQO en función de la concentración de Fe, Mo y V

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Media de cuadrados	Razón-F	Valor-P
X ₁	136.46	1	136.46	4.02	0.0851
X ₂	373.53	1	373.53	11.00	0.0128
X ₃	0.01	1	0.01	0.00	0.9900
X ₁ ²	170.69	1	170.69	5.03	0.0599
X ₁ X ₂	10.98	1	10.98	0.32	0.5874
X ₁ X ₃	86.31	1	86.31	2.54	0.1549
X ₂ ²	46.08	1	46.08	1.36	0.2823
X ₂ X ₃	0.04	1	0.04	0.00	0.9736
X ₃ ²	106.41	1	106.41	3.13	0.1200
Error total	237.73	7	33.96		
Total	1826.27	16			

A.3.5. ANOVA para la actividad nitrogenasa (μmol etileno/mg SSV) en función de la concentración de Fe, Mo y V

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Media de cuadrados	Razón-F	Valor-P
X ₁	226.44	1	226.44	9.765	0.0122
X ₂	3.76	1	3.76	0.162	0.6965
X ₃	0.78	1	0.78	0.034	0.8585
X ₁ X ₂	0.05	1	0.05	0.002	0.0599
X ₁ X ₃	18.68	1	18.68	0.805	0.9638
X ₂ X ₃	0.00	1	0.00	0.000	0.9907
X ₁ X ₂ X ₃	24.79	1	24.79	1.069	0.3282
Residuos	208.70	9	23.19		

Productos del proyecto de investigación

Artículos en revistas indizadas

- Guevara-López, E., Buitrón, G., 2015. Evaluation of different support materials used with a photo-fermentative consortium for hydrogen production. *Int. J. Hydrog. Energy*, 40, 17231–17238. doi:10.1016/j.ijhydene.2015.08.057
- Monroy, I., Guevara-López, E., Buitrón, G., 2016. A mechanistic model supported by data-based classification models for batch hydrogen production with an immobilized photo-bacteria consortium. *Int. J. Hydrog. Energy* 41, 22802–22811. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.10.100
- Monroy, I., Guevara-López, E., Buitrón, G., 2016. Biohydrogen production by batch indoor and outdoor photo-fermentation with an immobilized consortium: A process model with Neural Networks. *Biochem. Eng. J. (Sometido)*.
- Guevara-López E., Buitrón G. Optimization of lighting conditions and initial pH in photo-fermentation to improve H₂ production and COD removal with an immobilized PNSB consortium (*En preparación*).
- Guevara-López, E., Monroy I., Buitrón G. Indoor and outdoor continuous hydrogen production by photofermentation: Effect of the HRT on the consortium microbial diversity and a process model (*En preparación*).

Artículos de Divulgación

- Guevara-López Eliane. 2014. Las bacterias púrpuras fototróficas productoras de hidrógeno, *Gaceta UNAM Campus Juriquilla*. 29:12-13. Universidad Nacional Autónoma de México. http://www.campusjuriquilla.unam.mx/cac/gacetitas/Gaceta_29.pdf

Presentaciones en Congresos

- Guevara-López E. y Buitrón, G. Evaluation of different support materials used with a photo-fermentative consortium for hydrogen production. XIV International Congress of the Mexican Hydrogen Society. Cancún, México, 30 de septiembre al 4 de octubre de 2014. Presentación oral.
- Guevara-López E. y Buitrón, G. Selección de soportes para la inmovilización de bacterias fotofermentativas productoras de hidrógeno. 2.º Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Querétaro. Querétaro, México, 5-6 de noviembre de 2014. Cartel.
- Guevara-López, E., Díaz-Jiménez A. y Buitrón G. Influence of light intensity and wavelength on photo-fermentative hydrogen production using an immobilized consortium. 6th World Hydrogen Technologies Convention. Sydney, Australia, 11-14 de octubre de 2015. Presentación oral.
- Guevara-López E., Díaz A. y Buitrón, G. Influence of the irradiance intensity on a biofilm photobioreactor for hydrogen production. XVI International Congress of the Mexican Hydrogen Society, Querétaro, México, 26-30 de septiembre de 2016. Cartel
- Monroy I., Buitrón Germán y Guevara-López E. Mechanistic models for hydrogen production by photo-fermentation using an immobilized consortium of photobacteria. XVI International Congress of the Mexican Hydrogen Society, Querétaro, México, 26-30 de septiembre de 2016. Cartel
- Guevara-López E. y Buitrón, G. Producción continua de H₂ por fotofermentación bajo iluminación solar, usando un consorcio microbiano inmovilizado de bacterias púrpuras fototróficas. III Reunión Nacional de la Red Temática de Bioenergía, Morelia, México, 19-21 de octubre de 2016. Cartel.
- Monroy I., Buitrón Germán y Guevara-López E. Aplicación de redes neuronales al modelado de la producción de hidrógeno por foto-fermentación en batch. III Reunión Nacional de la Red Temática de Bioenergía, Morelia, México, 19-21 de octubre de 2016. Cartel.

- Guevara-López E. y Buitrón G. Efecto de la concentración inicial de biomasa sobre la producción de H₂ por fotofermentación con biomasa inmovilizada y bajo iluminación solar. Congreso Regional de Energías Renovables CIO, Aguascalientes, México, 9-11 de noviembre de 2016. Cartel.
- Guevara-López E. y Buitrón G. Effect of the hydraulic retention time on the hydrogen production using an immobilized consortium of photobacteria. 5th IWA México Young Water Professionals Conference, Morelia, México, 24-26 de mayo de 2017. Presentación oral.
- Buitrón G y Guevara-López E. Producción de hidrógeno por fotofermentación con un consorcio microbiano inmovilizado. XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Puerto Vallarta, México, 25-30 de junio de 2017. Presentación oral.
- Guevara-López, E., Monroy I., Buitrón G. Optimization of the light intensity and pH for photo-fermentative hydrogen production using an immobilized consortium. 15th IWA World Conference on Anaerobic Digestion, Beijing, China, 17-20 de octubre de 2017. Cartel.