



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

EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS OPERACIONALES DE UN
BIORREACTOR CON MEMBRANAS PARA LA
PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

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

PRESENTA:
CHRISTIAN EDUARDO HERNÁNDEZ MENDOZA

TUTOR PRINCIPAL
DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR
DRA. GEORGINA FERNÁNDEZ VILLAGÓMEZ, FACULTAD DE INGENIERÍA
DRA. GABRIELA ELEONORA MOELLER CHÁVEZ, IMTA

MÉXICO, D. F. NOVIEMBRE 2013

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Adalberto Noyola Robles
Secretario: Dra. Gabriela Eleonora Moeller Chávez
Vocal: Dra. Idania Valdez Vazquez
1^{er.} Suplente: Dr. Germán Buitrón Méndez
2^{do.} Suplente: Dra. Georgina Fernández Villagómez

Esta tesis se realizó en el Instituto de Ingeniería, Unidad Académica
Juriquilla. Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados
de Tratamiento de Aguas

TUTOR DE TESIS:

Dr. Germán Buitrón Méndez

FIRMA



Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante el proyecto 100298, así como por el Fondo para proyectos Internacionales del Instituto de Ingeniería de la UNAM.

Se agradece a la Coordinación de Estudios de Posgrado (CEP) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por la beca otorgada para la realización de los estudios de doctorado.

Se agradece la beca Marie Curie recibida mediante el proyecto BITA 295170 para realizar la estancia de investigación en el Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE) del Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Francia.



Para Abi y Xochitl

Por su invaluable apoyo

y todo su amor



AGRADECIMIENTOS

A Bibi por resistir mi ausencia durante el tiempo que me llevó alcanzar esta meta. A Xochitl, por tu cariño, comprensión, y por el invaluable apoyo durante la etapa final de esta aventura. Gracias por compartir conmigo esto que comenzó hace varios años.

A mis padres, por el apoyo que me han dado en todo momento. Les agradezco por enseñarme que con persistencia y esfuerzo se pueden alcanzar las metas que nos fijamos en la vida.

A los miembros de mi comité tutor, Dra. Georgina Fernández Villagómez y Dra. Gabriela Eleonora Moeller Chávez, por los comentarios que me hacían al evaluar mi avance semestral, los cuales permitieron mejorar la presentación y discusión de los resultados.

A los miembros del jurado, Dra. Idania Valdez Vazquez y Dr. Adalberto Noyola Robles, por su tiempo y sus valiosas aportaciones a esta tesis.

Al Dr. Germán Buitrón, coordinador del LIPATA, por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, por su apoyo y asesoría, y en especial por dejarme aprender un poco de él.

A todo el grupo de investigación del LIPATA por los comentarios y críticas que enriquecieron este trabajo, pero sobre todo por los momentos de regocijo que pasamos dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeros y amigos, Berenice, Ángeles, Torner, Ivonne, Gama, Carlitos, Marcelo (*James Di Bond*), Jorge y Víctor, por hacer tan ameno el trabajo en el laboratorio.

A los alumnos que tuve a mi cargo durante este tiempo en el LIPATA Valeria Martín, Karen Viacaba, Daniela Molina y Rogelio Axel Cervantes, por compartir algunos de los retos de esta investigación.



Agradecimientos especiales para Jaime Pérez T, Graciela Mar y Gloria Moreno, por su asistencia técnica durante los análisis físico-químicos y biológicos.

Al Dr. Eric Latrille, del Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE) del Institut National de la Recherche Agronomique, por transmitirme un poco de sus conocimientos y por abrirme las puertas de su casa durante mi estancia en Narbonne. A él y su hermosa familia, muchas gracias.

A Carlos Robles, Mohamed, Alessandro, Virginia, Mohanakrishna, Halima y Juliana por su amistad y ayuda durante mi estancia en Narbonne.

A todos aquellos que de alguna manera hicieron que tan interesante esta experiencia.

"TEMPORA LABUNTUR MORE FLUMENTIS AQUAE"



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	9
ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN	13
ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓN	17
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	23
1.1 EL HIDRÓGENO COMO VECTOR ENERGÉTICO.....	25
1.2 PRODUCCIÓN DE BIO-HITANO.....	26
1.3 TRATAMIENTO ANAEROBIO	28
1.4 PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO.....	30
1.4.1 PROCESO BIOQUÍMICO	30
1.4.2 PRINCIPALES ENZIMAS	31
1.4.3 TIPOS DE INÓCULO EMPLEADOS	33
1.4.3.1 CULTIVOS PUROS	33
1.4.3.2 CONSORCIOS MICROBIANOS	34
1.4.3.3 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DEL INÓCULO	35
1.5 BIORREACTORES EMPLEADOS EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO	36
1.5.1 BIORREACTORES CON MEMBRANAS	39
1.5.2 BIORREACTORES CON MEMBRANA A BASE DE LODO GRANULAR.....	42
1.5.3 MECANISMOS DE COLMATACIÓN DE LAS MEMBRANAS	44
1.5.4 MODELADO DEL FLUX Y LA RESISTENCIA DE LA MEMBRANA	46
1.6 INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS OPERACIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE BIO-HIDRÓGENO	47
1.6.1 TEMPERATURA.....	47
1.6.2 pH	48
1.6.3 TASA DE CARGA ORGÁNICA	49
1.6.4 TIEMPO DE RESIDENCIA HIDRÁULICA	50



1.6.5	CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y FOSFATO	51
1.6.6	CONCENTRACIÓN DEL HIERRO	51
1.6.7	PRESIÓN PARCIAL DEL HIDRÓGENO	52
1.6.8	PRESIÓN PARCIAL DEL DIÓXIDO DE CARBONO	53
1.7	SÍNTESIS DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS CON BIORREACTORES CON MEMBRANAS	54
1.8	JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS	56
CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS		59
2.1	HIPÓTESIS	61
2.2	OBJETIVO GENERAL	61
2.3	OBJETIVOS PARTICULARES	61
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS		63
3.1	DESARROLLO EXPERIMENTAL	65
3.2	PREPARACIÓN DEL AGUA RESIDUAL SINTÉTICA	67
3.3	INÓCULO	67
3.3.1	LODO ANAEROBIO FLOCULAR	67
3.3.2	LODO ANAEROBIO GRANULAR	67
3.4	DISPOSITIVOS EXPERIMENTALES	68
3.4.1	BIORREACTOR DISCONTINUO SECUENCIAL	68
3.4.2	BIORREACTORES UASB	69
3.4.2.1	BIORREACTOR EMPLEADO PARA EVALUAR EL EFECTO DEL pH INICIAL	69
3.4.2.2	BIORREACTOR EMPLEADO PARA EVALUAR EL EFECTO DE LA ALCALINIDAD	70
3.4.2.3	BIORREACTORES EMPLEADOS EN EL DESARROLLO DE LA ESTRATEGIA DE OBTENCIÓN DEL INÓCULO	71
3.4.2.4	BIORREACTOR EMPLEADO PARA EVALUAR EL EFECTO DE LA TCO Y DEL TRH	72
3.4.3	BIORREACTOR TEÓRICO EMPLEADO PARA LA MODELACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIO-HITANO	74
3.4.4	SISTEMA AUTOMATIZADO DE BIODEGRADABILIDAD ANAEROBIA	75
3.5	TÉCNICAS ANALÍTICAS	76
3.5.1	SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES Y VOLÁTILES	76
3.5.2	DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO	76
3.5.3	CARACTERIZACIÓN DEL BIOGÁS	76
3.5.4	CUANTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES, ETANOL Y ACETONA	76
3.5.5	CUANTIFICACIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS	77
3.5.6	CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS	77
3.5.7	TINCIÓN DE LOS GRÁNULOS CON MARCADORES MOLECULARES FLUORESCENTES	77
3.6	BIOLOGÍA MOLECULAR	78



3.7	ANÁLISIS CINÉTICO.....	80
3.8	BALANCE DE ELECTRONES-EQUIVALENTES.....	80
CAPÍTULO 4. EFECTO DEL pH INICIAL Y LA ALCALINIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE BIO-HIDRÓGENO.....		
81		
4.1	INTRODUCCIÓN.....	83
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	84
4.3	RESULTADOS.....	85
4.3.1	EFECTO DEL pH INICIAL.....	85
4.3.2	EFECTO DE LA ALCALINIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO.....	86
4.4	CONCLUSIONES PARCIALES.....	87
CAPÍTULO 5. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EMPLEANDO DIFERENTES BIOMASAS.....		
89		
5.1	INTRODUCCIÓN.....	91
5.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	93
5.3	RESULTADOS.....	94
5.3.1	ACLIMATACIÓN DE LA BIOMASA FLOCULAR.....	94
5.3.2	DESEMPEÑO DE LOS MICROORGANISMOS QUE SEDIMENTAN Y QUE NO SEDIMENTAN.....	95
5.3.3	DISTRIBUCIÓN DE LOS METABOLITOS PRODUCIDOS.....	96
5.3.4	ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS.....	98
5.3.5	BALANCE DE ELECTRONES-EQUIVALENTES.....	101
5.3.6	BIOMASA GRANULAR.....	102
5.4	CONCLUSIONES PARCIALES.....	104
CAPÍTULO 6. SUPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD METANOGÉNICA SOBRE LODO GRANULAR ANAEROBIO PARA LA GENERACIÓN DE INÓCULO PRODUCTOR DE HIDRÓGENO.....		
105		
6.1	INTRODUCCIÓN.....	107
6.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	109
6.3	RESULTADOS.....	110
6.3.1	PRUEBAS PRELIMINARES.....	110
6.3.1.1	DESEMPEÑO DEL BIORREACTOR.....	110
6.3.1.2	DISTRIBUCIÓN DE LOS METABOLITOS PRODUCIDOS.....	113
6.3.2	OPERACIÓN EN CONTINUO.....	115
6.3.2.1	MORFOLOGÍA DE LOS GRÁNULOS.....	115
6.3.2.2	ESTABILIDAD DEL BIORREACTOR.....	117
6.3.2.3	DISTRIBUCIÓN DE LOS METABOLITOS SOLUBLES.....	119
6.3.3	ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD MICROBIANA.....	120
6.4	CONCLUSIONES PARCIALES.....	124



CAPÍTULO 7. INFLUENCIA DE LA TASA DE CARGA ORGÁNICA EN LA PRODUCCIÓN DE BIO-HIDRÓGENO	125
7.1 INTRODUCCIÓN	127
7.2 MATERIALES Y MÉTODOS	128
7.3 RESULTADOS	128
7.3.1 EFECTO SOBRE LOS GRÁNULOS MICROBIANOS	128
7.3.2 DESEMPEÑO DEL BIORREACTOR	130
7.3.3 METABOLITOS SOLUBLES PRODUCIDOS	132
7.3.4 EVOLUCIÓN DE LAS RESISTENCIAS DE LA MEMBRANA	135
7.3.5 BALANCE DE ELECTRONES-EQUIVALENTES	138
7.4 CONCLUSIONES PARCIALES	139
CAPÍTULO 8. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE RESIDENCIA HIDRÁULICA EN LA PRODUCCIÓN DE BIO-HIDRÓGENO	141
8.1 INTRODUCCIÓN	143
8.2 MATERIALES Y MÉTODOS	143
8.3 RESULTADOS	144
8.3.1 EFECTO SOBRE LOS GRÁNULOS MICROBIANOS	144
8.3.2 DESEMPEÑO DEL BIORREACTOR	145
8.3.3 METABOLITOS SOLUBLES PRODUCIDOS	147
8.3.4 EVOLUCIÓN DE LAS RESISTENCIAS DE LA MEMBRANA	150
8.3.5 BALANCE DE ELECTRONES-EQUIVALENTES	153
8.4 CONCLUSIONES PARCIALES	154
CAPÍTULO 9. OPTIMIZACIÓN TEÓRICA DE LA PRODUCCIÓN DE BIO-HITANO EN UN SISTEMA DE DOS ETAPAS	155
9.1 INTRODUCCIÓN	157
9.2 MATERIALES Y MÉTODOS	158
9.3 RESULTADOS	161
9.4 CONCLUSIONES PARCIALES	166
CONCLUSIONES	167
REFERENCIAS	173
PUBLICACIONES DERIVADAS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DOCTORAL	203
PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES INDIZADAS	205
PUBLICACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES	205
PUBLICACIONES EN CONGRESOS NACIONALES	206



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Diagrama del bioproceso de tratamiento anaerobio.	29
Figura 1.2. Espectro de separación de las membranas.	40
Figura 1.3. Arreglos típicos de los biorreactores con membranas.	41
Figura 1. 4. Distribución de los microorganismos en un gránulo anaerobio.	43
Figura 1.5. Interrelaciones de los parámetros que influyen en la colmatación de la membrana.	45
Figura 1.6. Efecto de la pH_2 en la producción de bio-hidrógeno.	52
Figura 3.1. Diagrama de la estrategia experimental seguida.	66
Figura 3.2. Biorreactor empleado para la aclimatación de la biomasa flocular.	68
Figura 3.3. Biorreactor UASB empleado para la evaluación del efecto del pH inicial.	69
Figura 3.4. Biorreactor UASB utilizado para la evaluación del efecto de la alcalinidad.	70
Figura 3.5. Biorreactor UASB utilizado para el desarrollo de la estrategia de obtención del inóculo bajo una régimen de flujo continuo.	72
Figura 3.6. Biorreactor UASB empleado para evaluar el efecto de la TCO y del TRH.	73
Figura 3.7. Sistema de digestión en dos etapas empleado para la modelación de la producción de bio-hitano.	74
Figura 3. 8. Equipo empleado en las pruebas bioquímicas de producción de hidrógeno.	75
Figura 4.1. Evolución del pH_i de 7.3.	86
Figura 5.1. Desempeño del biorreactor durante la etapa de aclimatación del inóculo.	94
Figura 5.2. Distribución de los metabolitos solubles producidos por la biomasa sedimentable y no sedimentable.	97
Figura 5.3. Microorganismos observados a una amplificación de 10x.	98



Figura 5.4. Perfiles de la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) de la biomasa que A) no sedimenta y B) que sedimenta.....	99
Figura 5.5. Distribución de metabolitos solubles producidos por el lodo granular.	102
Figura 6.1. Gránulos teñidos obtenidos a diferentes TRH.	111
Figura 6.2. Evolución del biogás producido durante la adaptación A) discontinua y B) continua de los gránulos anaerobios.....	112
Figura 6.3. Gránulos teñidos.	116
Figura 6.4. Evolución del biogás producido.	118
Figura 6.5. Distribución de los metabolitos solubles.	119
Figura 6.6. Perfiles de la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) de los gránulos durante su adaptación para la producción de hidrógeno.....	121
Figura 6.7. Similitud de las comunidades microbianas en el biorreactor operado de manera discontinua secuencial a diferentes TRH.....	123
Figura 7.1. Efecto de la TCO en el diámetro de los gránulos y en la producción de EPS.	129
Figura 7.2. Evolución de la producción de bio-hidrógeno a diferentes TCO.....	131
Figura 7.3. Metabolitos solubles producidos a diferentes TCO.....	133
Figura 7.4. Evolución de la permeabilidad de la membrana a las distintas TCO aplicadas.	135
Figura 7.5. Evolución de la resistencia de la membrana a diferentes TCO.	137
Figura 8.1. Evolución de la producción de EPS y variación del diámetro de los gránulos respecto a la reducción del TRH.	145
Figura 8.2. Evolución de la producción de bio-hidrógeno a diferentes TRH aplicados.....	146
Figura 8.3. Distribución de los metabolitos solubles durante la variación del TRH.....	147
Figura 8.4. Variación de la producción de bio-hidrógeno con el aumento de la producción de ácido acético.....	148
Figura 8.5. Evolución de la permeabilidad de la membrana a diferentes TRH.	150
Figura 8.6. Evolución de la resistencia de la membrana a diferentes TRH.	152



Figura 9.1. Producción de bio-hitano A) sin alimentación de glucosa ni vinazas, B) alimentando sólo vinazas y C) alimentando únicamente glucosa.....162

Figura 9.2. Producción de bio-hitano a diferentes flujos de vinazas. 164

Figura 9.3. Evolución de la tasa de producción de bio-hitano a una concentración de bio-hidrógeno del A) 5% y B) 20%.165





ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Comparación de las propiedades de algunos combustibles.	27
Tabla 1.2. Clasificación de las enzimas hidrogenasas.....	33
Tabla 1.3. Estudios realizados con biorreactores con membranas para la producción de hidrógeno.	55
Tabla 4.1. Producción de bio-hidrógeno a diferentes niveles de pH inicial.	85
Tabla 4.2. Producción de bio-hidrógeno a diferentes niveles de alcalinidad.	87
Tabla 5.1. Parámetros del modelo de Gompertz ajustado a la producción de hidrógeno por los microorganismos sedimentables y no sedimentables.	95
Tabla 5.2. Balance electrones-equivalentes para las diferentes biomásas probadas.	101
Tabla 6.1. Distribución de los metabolitos solubles durante la etapa exploratoria.....	114
Tabla 6.2. Identificación de las bandas obtenidas en el análisis de la comunidad microbiana.....	122
Tabla 7.1. Balance de electrones-equivalentes (como mg-DQO) para las TCO probadas.	138
Tabla 8.1. Estimación del consumo de hidrógeno por acetogénesis.	149
Tabla 8.2. Balance de electrones-equivalentes (como mg-DQO) para los diferentes TRH aplicados.....	153





ABREVIATURAS

AGV	Ácidos grasos volátiles
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosin trifosfato
CO _x	Óxidos de carbono
CSTR	Biorreactor de tanque continuamente agitado
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
DQO	Demanda química de oxígeno
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares
EtOH	Etanol
Fd	Ferredoxin
Fd(ox)	Ferredoxin oxidado
Fd(red)	Ferredoxin reducido
<i>g</i>	Constante de aceleración de la gravedad
GPH	Gránulos productores de hidrógeno
HAc	Ácido acético
HBu	Ácido butírico



J	Flujo permeado o flux
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótide
NO _x	Óxidos de nitrógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PN	Proteínas
pK _a	Constante de disociación del ácido
PS	Polisacáridos
PTM	Presión transmembrana
SO _x	Óxidos de azúfre
SBR	Biorreactor discontinuo secuencial
TCO	Tasa de carga orgánica
TEPH	Tasa específica de producción de bio-hidrógeno
TPH	Tasa de producción de bio-hidrógeno
TRH	Tiempo de residencia hidráulica
TRS	Tiempo de retención de sólidos
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
UASB	Biorreactor de lecho de lodos con flujo ascendente
Y _{H₂}	Rendimiento de la producción de bio-hidrógeno
Da	Dalton



RESUMEN

En este trabajo se determinaron las mejores condiciones de obtención del inóculo productor de bio-hidrógeno y se evaluaron los parámetros de operación (tasa de carga orgánica y tiempo de residencia hidráulica) de un biorreactor con membranas para incrementar la producción de hidrógeno. En una primera etapa se analizó el efecto del pH inicial y la alcalinidad en la producción de bio-hidrógeno. La mayor producción de bio-hidrógeno se observó a un pH inicial de 7.0 ± 0.1 . Mientras que la producción de bio-hidrógeno no dependió del nivel de alcalinidad agregada al sistema.

En seguida se evaluaron diferentes tipos de biomasa para determinar cuál de ellas era la mejor fuente de inóculo. El lodo granular presentó una tasa específica de producción de hidrógeno ($28 \text{ mL}_{\text{H}_2} \text{ g-SSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$) mayor que la obtenida con el lodo flocular ($25 \text{ mL}_{\text{H}_2} \text{ g-SSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$), por lo que se decidió emplear el lodo granular como fuente de inóculo en el resto de la experimentación.

Posteriormente se evaluaron dos metodologías de obtención del inóculo y se observó que la adaptación discontinua del inóculo afectó la actividad de las arqueas metanogénicas pero no se suprimió totalmente su actividad. Sin embargo, la adaptación continua suprimió exitosamente la actividad metanogénica de los gránulos inoculados, observándose una producción estable de bio-hidrógeno.

La producción de bio-hidrógeno se mantuvo estable a una tasa de carga orgánica (TCO) de hasta $30 \text{ kg-glucosa m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ mientras que una carga mayor resultó en una producción inestable. Durante la variación de la TCO se observó que el mayor rendimiento se observó a una TCO de $7 \text{ kg-glucosa m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, mientras que la mayor producción de bio-hidrógeno se obtuvo a una carga de $30 \text{ kg-glucosa m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

Bajo la condición de TCO de $30 \text{ kg-glucosa m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, y reduciendo el tiempo de residencia hidráulica (TRH), se encontró que la producción de bio-hidrógeno fue más sensible a las variaciones del TRH, en comparación con el rendimiento de la producción de bio-hidrógeno. Durante la variación del TRH, la mayor producción de bio-hidrógeno se obtuvo a un tiempo de residencia hidráulica de 4 h. Tanto en el caso de la variación de la carga orgánica como del



tiempo de residencia hidráulica, el principal mecanismo de colmatación de la membrana se debió al bloqueo de los poros.

Por lo tanto, se concluyó que a un pH de 4.5, una TCO de $30 \text{ kg-glucosa m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ y un TRH de 4 h, la producción de bio-hidrógeno alcanzó una producción máxima de $475 \pm 15 \text{ mL-H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con un rendimiento de $2.8 \pm 0.1 \text{ mol H}_2/\text{mol glucosa}$.

Palabras clave: digestión anaerobia; actividad metanogénica; bio-hidrógeno; bio-hitano; presión de selección; SBR; UASB; biorreactor con membranas; lodo granular; tasa de carga orgánica; tiempo de residencia hidráulica; marcadores moleculares fluorescentes; biología molecular.



ABSTRACT

In this work the best conditions to obtain the hydrogen-producing inoculum were determined. Also, the influence of the operating parameters (organic loading rate and hydraulic retention time) of a membrane bioreactor was studied to increase the hydrogen production. In a first stage, the effect of initial pH and alkalinity in bio-hydrogen production were evaluated. The higher hydrogen production was observed at an initial pH of 7.0 ± 0.1 while the level of alkalinity added to the system did not affect the bio-hydrogen production.

Different types of biomasses were evaluated to determine which one was the best source of inoculum. Granular sludge showed a higher specific hydrogen production rate ($28 \text{ mL}_{\text{H}_2} \text{ g-VSS}^{-1} \text{ h}^{-1}$) than the one obtained with floccular sludge ($25 \text{ mL}_{\text{H}_2} \text{ g-VSS}^{-1} \text{ h}^{-1}$). So, it was decided to use the granular sludge as inoculum. After that, two methods were evaluated to obtain the hydrogen-producing inoculum. It was found that the discontinuous adaptation of the granules affected the activity of methanogens but its activity was not suppressed. However, the continuous adaptation successfully suppressed the methanogenic activity of the seeded granules and showed a stable hydrogen production.

Bio-hydrogen production was stable at organic loads up to $30 \text{ kg-glucose m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ while a higher load resulted in unstable hydrogen production. The highest bio-hydrogen production was obtained at an organic loading rate of $30 \text{ kg-glucose m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. On the other hand, the hydrogen production was sensitive to the hydraulic retention time variations reaching a maximum production at a hydraulic retention time of 4 h. In both cases, the organic loading rate and hydraulic retention time variations, the main membrane fouling mechanism was due to pore blocking.

Thus, it was concluded that a pH of 4.5, an organic loading rate of $30 \text{ kg-glucose m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ and a hydraulic retention time of 4 h, the bio-hydrogen production was favored and reached a maximum of $475 \pm 15 \text{ mL}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ at a yield of $2.8 \pm 0.1 \text{ mol H}_2/\text{mol glucose}$.

Key words: anaerobic digestion; methanogenic activity; bio-hydrogen; bio-hythane; selection pressure; SBR; UASB; membrane bioreactor; granular sludge; organic loading rate; hydraulic retention time, fluorescent molecular tags, molecular biology.





INTRODUCCIÓN





La energía es un motor fundamental para el desarrollo de las sociedades y la calidad de vida de las personas. Durante más de un siglo la energía de origen fósil ha favorecido la industrialización de muchos países, y los estándares de vida de sus habitantes son cada vez más altos (Bauen, 2006). Sin embargo, el crecimiento demográfico en el último siglo se ha multiplicado por un factor de 4 mientras que la demanda energética se ha multiplicado por un factor de 24 (Züttel et al., 2008).

Aunque la demanda energética mundial promedio es de 2 kW per cápita hay zonas en la que la demanda energética es mucho mayor. En los Estados Unidos de Norteamérica el consumo promedio de energía es de 10 kW per cápita mientras que en Europa el consumo promedio es de 5 kW per cápita (Züttel et al., 2008). Para satisfacer estas demandas energéticas se ha incrementado la extracción de los combustibles fósiles, los cuales constituyen una fuente de energía no renovable.

Actualmente, más del 80% de las necesidades energéticas mundiales se satisfacen mediante el uso de combustibles de origen fósil, lo cual genera la emisión de grandes cantidades de gases de efecto invernadero hacia la atmósfera, acelerando con ello el proceso de cambio climático. Si hasta la fecha el uso de los combustibles de origen fósil ha logrado satisfacer los requerimientos energéticos de la población mundial, esto no se puede mantener en el futuro. Así, el principal desafío ambiental al que nos enfrentamos consiste en asegurar la suficiencia energética y disminuir, simultáneamente, las emisiones de dióxido de carbono a la atmósfera (Logan, 2008).

Dentro de las opciones que se han explorado, el biogás producido mediante el tratamiento biológico anaerobio de los residuos puede llegar a tener un papel importante en la economía energética del futuro. A nivel mundial se ha indicado que el hidrógeno es un vector energético que puede llegar a emplearse como sustituto de los combustibles fósiles. Esto se debe a que tiene un contenido energético 2.75 veces mayor al de los combustibles fósiles, además de que su combustión sólo genera agua como subproducto.

Un vector energético (o portador de energía) es la sustancia, el compuesto o elemento químico, o el fenómeno físico que permite el transporte, en el tiempo y el espacio, de una cantidad dada de energía. Más precisamente, un vector (sustancia o fenómeno) permite el transporte de un potencial de energía, ya que lo que se traslada en el tiempo y en el espacio es



la capacidad “potencial” de una sustancia dada o de un fenómeno dado para permitir su conversión en una energía útil. Sin embargo, por convención, se hace referencia al vector energético en lugar del vector de potencial de energía. (Orecchini y Naso, 2012)

La producción biológica de hidrógeno (bio-hidrógeno) mediante la fermentación de los residuos orgánicos depende de diversas variables, tales como el origen y forma de obtención del inóculo, el tipo de biorreactor empleado, los parámetros de operación, entre otros. El principal reto al que se enfrenta la investigación y desarrollo de los sistemas productores de bio-hidrógeno consiste en incrementar su producción a fin de que su implementación a gran escala resulte factible.

En el presente trabajo se abordan dos factores que afectan la eficiencia de la producción de bio-hidrógeno: el modo de obtención del inóculo y los parámetros de operación (tasa de carga orgánica y tiempo de residencia hidráulica) de un biorreactor con membranas sumergidas. En el Capítulo 1 se presenta una revisión del estado del arte a fin de poder identificar las principales variables que afectan al proceso de producción de bio-hidrógeno. Posteriormente, en los Capítulos 2 y 3 se establece la propuesta de los trabajos que se realizaron en éste estudio.

A manera de estudio preliminar, en el Capítulo 4, se evaluó el efecto del pH inicial y de la alcalinidad en la producción de bio-hidrógeno para determinar su influencia en el proceso y establecer la necesidad de mantenerlos controlados durante la experimentación. Posteriormente, en el Capítulo 5 se evaluó la producción de bio-hidrógeno empleando diferentes tipos de biomasa para determinar cuál de ellas producía más hidrógeno y, por ende, cuál era la mejor fuente de inóculo.

En el Capítulo 6 se evaluaron dos metodologías de obtención del inóculo productor de hidrógeno, a fin de suprimir la actividad consumidora de hidrógeno y favorecer, al mismo tiempo, su producción. Hasta aquí, los resultados obtenidos sirvieron de base para definir las mejores condiciones de obtención del inóculo y llevar a cabo el arranque exitoso del biorreactor productor de hidrógeno.

En el Capítulo 7 se evaluó la influencia del incremento de la tasa de carga orgánica en la producción de bio-hidrógeno en el reactor con membranas sumergidas. A partir de los resultados obtenidos se determinó la carga orgánica a la cual se incrementa la velocidad de



producción de bio-hidrógeno y se mantuvo fija para evaluar el efecto de la reducción del tiempo de residencia hidráulica (Capítulo 8). Con los resultados obtenidos fue posible definir la combinación de los parámetros de operación del biorreactor con membranas sumergidas para incrementar la producción de bio-hidrógeno.

En el Capítulo 9 se llevó a cabo la modelación de la producción de bio-hitano, el cual es una mezcla de bio-hidrógeno con bio-metano, para determinar la factibilidad de obtener una mezcla de bio-metano enriquecida con un 5% al 20% de bio-hidrógeno para obtener los beneficios ambientales obtenidos con esta mezcla, tales como la reducción en las emisiones de gases de efecto invernadero e hidrocarburos no quemados, así como su empleo en los motores de combustión interna sin tener que modificar su diseño.

En el Capítulo de Conclusiones se enuncian los principales hallazgos obtenidos en este trabajo.





CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Publicaciones derivadas de este capítulo

Hernández-Mendoza CE, Buitrón G (2010). Fermentative hydrogen production on membrane bioreactors: A mini review. 12th IWA Specialist Conference on Anaerobic Digestion. 31 de octubre al 4 de noviembre. Guadalajara, México.





1.1 EL HIDRÓGENO COMO VECTOR ENERGÉTICO

Los escenarios muestran que en este siglo tanto la demanda energética como la concentración de gases de efecto invernadero en la atmósfera se incrementarán rápidamente, siendo las emisiones de CO₂ derivadas del uso de combustibles fósiles las de mayor impacto (IPCC, 2011). Aproximadamente el 85% de las necesidades energéticas mundiales se satisfacen mediante el empleo de combustibles fósiles (IPCC, 2011). La combustión de estas fuentes de energía emite diversos agentes contaminantes, como el CO_x, NO_x, SO_x, C_xH_x, hollín, cenizas y otros compuestos, los cuales al liberarse a la atmósfera contribuyen al proceso de cambio climático.

La seguridad energética es otro reto mundial importante debido a que la mayoría de las reservas de gas y petróleo convencional se localizan en regiones políticamente inestables (Weiland, 2010). En el mundo existen aproximadamente 1 500 yacimientos de gran importancia, los cuales contienen el 94% del petróleo conocido, de estos, los 400 yacimientos más importantes contienen entre el 60% y 70% del total del petróleo (Rifkin, 2002).

Se ha establecido que “estamos consumiendo casi dos barriles de petróleo crudo por cada barril que se descubre” (Rifkin, 2002). Debido a que esta fuente de energía no es renovable, resulta necesario buscar otras fuentes de energía que sean capaces de compensar la disminución de la producción y las reservas de petróleo, para que posteriormente se pueda llegar a establecer una nueva economía basada en dichas fuentes de energía, las cuales deben ser eficientes y amigables con el ambiente.

Para lograr esto se requiere desarrollar una nueva plataforma energética capaz de generar suficiente energía y, al mismo tiempo, se reduzcan las emisiones de dióxido de carbono a la atmósfera. Una solución adecuada, tanto para la producción de energía como para el ambiente, parece estar en la investigación y desarrollo de fuentes de energía renovables (Logan, 2008).

La biotecnología anaerobia permite obtener subproductos valiosos (como el hidrógeno, el metano y los ácidos grasos) durante el tratamiento de los residuos líquidos y sólidos. El biogás es una fuente versátil de energía renovable. Se puede emplear para reemplazar a los combustibles de origen fósil en la producción de electricidad y calor, y como combustible para los vehículos automotores (Weiland, 2010). A nivel mundial se ha sugerido el empleo del



hidrógeno como vector energético del futuro, debido a que presenta varias ventajas sobre el empleo de los combustibles fósiles, tales como un alto contenido energético por unidad de peso (122 kJ/g) en comparación con otros combustibles fósiles (gasolina: 48 kJ/g, gas natural: 44 kJ/g), su combustión genera agua, reduce las emisiones de óxidos de nitrógeno cuando se mezcla con el gas natural comprimido para emplearlo como fuente de energía para los motores de combustión interna (U. S. Department of Energy, 2009), su combustión en vehículos automotores es 50% más eficiente que la gasolina (Reith et al., 2003), su eficiencia de conversión en electricidad puede duplicarse si se emplean celdas de combustible en vez de turbinas de gas (Reith et al., 2003), y un kilogramo de hidrógeno puede llegar a generar 39 kWh de energía eléctrica.

Actualmente, la producción de hidrógeno en estado gaseoso se realiza principalmente por reformado del gas natural con vapor (40%), a partir del petróleo y nafta (30%), a partir del carbón (18%) y de la electrólisis del agua (4%) (Sinha y Pandey, 2011). Desafortunadamente, estos procesos liberan la misma cantidad de dióxido de carbono que el que se forma mediante la combustión de los combustibles fósiles (Lee et al., 2009). Por lo que resulta necesario explorar rutas alternas para su producción.

Una opción para generar hidrógeno de manera sustentable es mediante el empleo de la biotecnología anaerobia, la cual combina el tratamiento de los residuos con la obtención de subproductos valiosos como el hidrógeno y el metano.

1.2 PRODUCCIÓN DE BIO-HITANO

La transición de una economía basada en combustibles fósiles a una economía basada en el hidrógeno se enfrenta a muchos desafíos. Actualmente, la mayor parte de la producción de hidrógeno se realiza a través de los materiales de origen fósil. Incluso, el hidrógeno se utiliza más como un compuesto químico en lugar de usarlo como un combustible (Ramachandran y Menon, 1998). La producción, almacenamiento, transporte, distribución y uso del hidrógeno son los puntos clave para la transición a una economía basada en el hidrógeno.

Una solución para reducir el riesgo asociado con el hidrógeno consiste en mezclarlo con otros gases, e. g. el gas natural, el cual está compuesto principalmente por metano (85% - 98%). Debido a las características que posee el hidrógeno como combustible, tales como el



que se requiere de concentraciones entre el 4% y 74% para explotar (CRYOINFRA, 2009) y a que el gas natural explota a concentraciones entre 4.5% y 14.5% (Pemex, 2000), su nivel de riesgo, a presión ambiente, es similar a la de otros combustibles (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Comparación de las propiedades de algunos combustibles.

Propiedad		Hidrógeno	Gas natural	Gasolina	Gas LP
Contenido energético (MJ/kg)	Bajo	123	51	43 - 45	47
	Alto	145	56	45 - 49	51
Densidad en condiciones estándar (kg/L)		8×10^{-5}	6×10^{-4}	0.072 - 0.78	0.51
Fase en condiciones estándar		Gas	Gas	Líquido	Líquido
Temperatura de auto ignición en el aire (°C)		566 - 582	540	257	454 - 510
Coeficiente de difusión (cm ² /s)		0.61	0.16	0.05	0.11
Toxicidad a los humanos		No tóxico, asfixiante	No tóxico, asfixiante	Veneno, irritante para los pulmones, estómago y piel	No tóxico, asfixiante

Fuente: adaptada de Lobato et al., 2006.

Varios investigadores han estudiado los efectos del uso del hidrógeno mezclado con el gas natural. La mezcla de hidrógeno y metano obtenida mediante algún proceso biológico recibe el nombre de bio-hitano (Cavinato et al., 2012). Se considera que el bio-hitano es un combustible importante para lograr la transición de la economía basada en combustibles fósiles a una economía basada en el hidrógeno (Das et al., 2000).

El uso del hidrógeno como un aditivo tiene ventajas, tales como el que se puede utilizar en los motores de combustión interna sin modificar el diseño del motor (a un bajo contenido de hidrógeno en la mezcla), reduce la emisión de gases de efecto invernadero, reduce la emisión de hidrocarburos no quemados y mejora la eficiencia del ciclo térmico, lo que se traduce en un menor consumo energético (Villante y Genovese, 2012).

Durante la última década, se ha puesto mucha atención en el uso potencial del hidrógeno como fuente de combustible para el servicio de transporte y la generación de energía (Gavala et al., 2006). En países como Holanda, la República Federal de Alemania, el Reino Unido, el



Canadá, los Estados Unidos de Norteamérica y el Brasil, se han implementado autobuses para el transporte público de pasajeros a base de hidrógeno. Tanto en los automóviles como en los autobuses el hidrógeno se bombea hacia el tanque y de allí se alimenta a la celda de combustible donde se transforma electroquímicamente en electricidad. En este proceso no se lleva a cabo una combustión y sólo se emite vapor de agua. La electricidad generada se usa para mover al vehículo. En comparación con los motores tradicionales a base de gasolina o diésel, el uso de los motores a base de hidrógeno tiene una eficiencia energética 2 a 3 veces mayor (Canadian Hydrogen and Fuel Cell Association, 2012). Aunque se gana mucho, en términos de la reducción de las emisiones a la atmósfera y de eficiencia energética, mediante el uso del hidrógeno como fuente de energía para los automóviles, la percepción pública que se tiene sobre su uso ha limitado su empleo. Esto contrasta con la idea pública que se tiene sobre el uso del gas natural (metano) en los vehículos.

El hidrógeno se ha utilizado comercialmente como combustible en los vehículos automotores en los Estados Unidos de Norteamérica y en la India, así como en autobuses en Beijín y ha recibido bastante atención por parte de compañías como Volvo y Fiat (Liu et al., 2013). Durante los últimos 20 años se ha promovido intensamente el uso del hidrógeno en la infraestructura para el transporte público alrededor del mundo (Midha et al., 2011). Tal es el caso de los vehículos para el traslado hacia el aeropuerto en San Francisco, en los Estados Unidos de Norteamérica, y los autobuses en Beijín (Midha et al., 2011).

Actualmente, el uso del hidrógeno es la opción más rentable del hidrógeno debido a que puede emplear la infraestructura existente para el gas natural, la cual podría seguir siendo útil en la economía del hidrógeno (Midha et al., 2011). Además, el uso del hidrógeno sería una buena opción para satisfacer las necesidades energéticas y de protección al ambiente, a la vez que mejoraría la percepción pública sobre el uso del hidrógeno como combustible.

1.3 TRATAMIENTO ANAEROBIO

El tratamiento anaerobio es un proceso biológico complejo en el cual la materia orgánica se transforma principalmente en dióxido de carbono y metano (Figura 1.1). Este proceso consta de cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.



La hidrólisis es la etapa en la que los compuestos orgánicos complejos, como las proteínas, carbohidratos y lípidos, se transforman en productos solubles más simples, tales como los aminoácidos, azúcares y ácidos grasos de cadena larga, mediante la excreción de enzimas extracelulares generadas por las bacterias fermentativas.

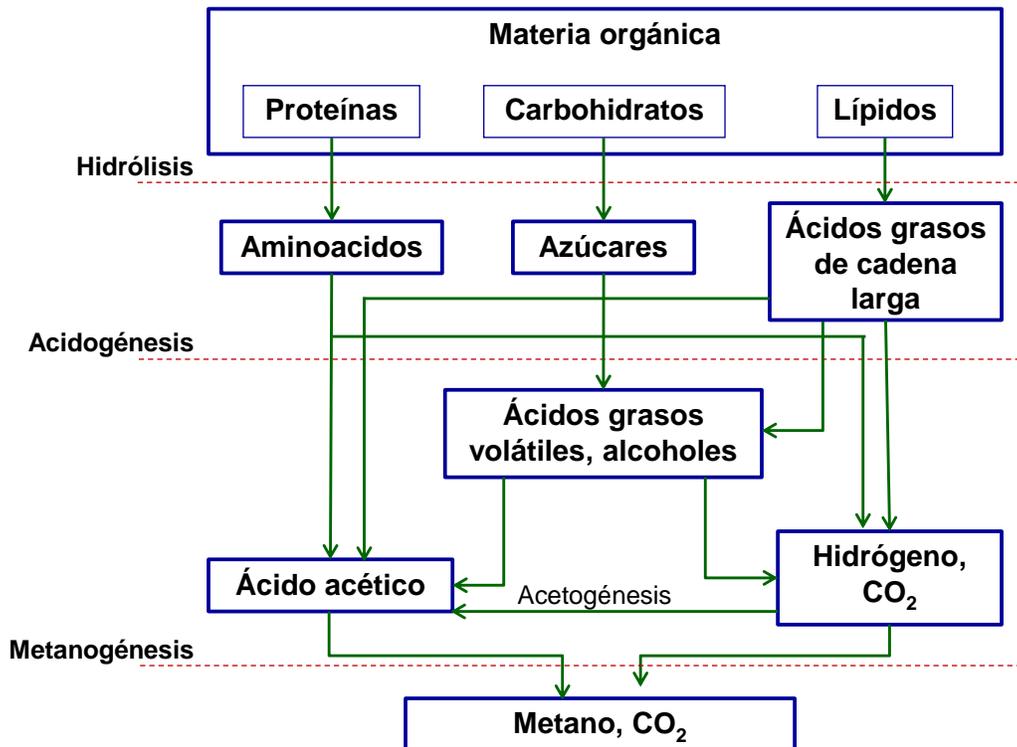


Figura 1.1. Diagrama del bioproceso de tratamiento anaerobio.

Fuente: adaptado de Reith et al., 2003

Durante la acidogénesis se lleva a cabo la transformación de las moléculas orgánicas solubles, generadas en la hidrólisis, en una mezcla de ácidos orgánicos, hidrógeno y dióxido de carbono. Asimismo, se generan ácidos grasos volátiles (AGV), tales como los ácidos propiónico, butírico, valérico, láctico, y alcoholes, como el etanol.

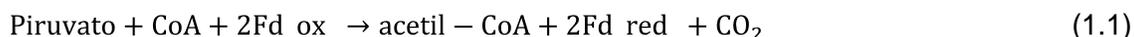
En la acetogénesis, las bacterias acetogénicas transforman el hidrógeno y el dióxido de carbono en ácido acético. Finalmente, los microorganismos metanogénicos utilizan los productos generados en las etapas anteriores transformándolos en metano y dióxido de carbono.



1.4 PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO

1.4.1 PROCESO BIOQUÍMICO

En el proceso de producción de bio-hidrógeno, inicialmente la glucosa se convierte a piruvato mediante la glicolisis produciendo la forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH). El piruvato se oxida a acetyl-CoA, que puede convertirse a acetyl fosfato y causa la generación de adenosin trifosfato (ATP) y la excreción de acetato. La oxidación del piruvato a acetyl-CoA requiere la reducción del ferredoxin (Fd). La hidrogenasa oxida al Fd reducido [Fd(red)], lo cual genera ferredoxin oxidado [Fd(ox)] y libera electrones para producir hidrógeno molecular. La reacción total del proceso se puede escribir como: (Nath y Das, 2005)

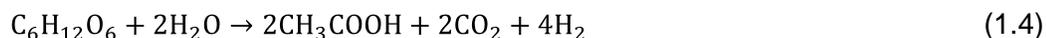


Se puede producir bio-hidrógeno a partir de la transformación de una amplia gama de sustratos, incluyendo desechos o productos rechazados. Los carbohidratos, principalmente la glucosa, son las principales fuentes de carbono en los procesos de producción de bio-hidrógeno, los cuales producen principalmente ácido acético y butírico junto con el hidrógeno. Si se considera a la glucosa como un sustrato modelo, su oxidación completa produce 12 moles de hidrógeno, sin embargo, esta reacción no es termodinámicamente posible.



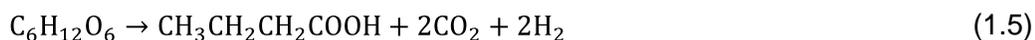
$$\Delta G^\circ = +3.2 \text{ kJ}$$

En la práctica el rendimiento es menor. Dependiendo de la ruta metabólica y de los subproductos finales, es posible obtener diferentes rendimientos de hidrógeno. Por ejemplo, cuando el ácido acético es el principal subproducto se puede obtener un máximo de 4 moles de hidrógeno por cada mol de glucosa transformada. Este es el rendimiento máximo que se puede esperar experimentalmente.



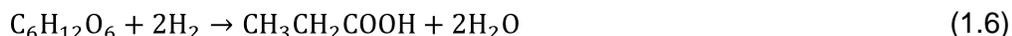
$$\Delta G^\circ = -206 \text{ kJ}$$

Si el ácido butírico es el principal subproducto, el rendimiento máximo es de 2 moles de hidrógeno por cada mol de glucosa transformada.



$$\Delta G^\circ = -254 \text{ kJ}$$

No obstante, también es posible consumir hidrógeno durante la fermentación de la glucosa. Así, cuando se produce ácido propiónico, se consumen 2 moles de hidrógeno por cada mol de ácido propiónico.



Cuando los ácidos propiónico y acético están presentes en la fermentación se puede generar ácido valérico de acuerdo a la siguiente reacción 1.7.



También es posible consumir hidrógeno cuando se produce ácido acético mediante acetogénesis (reacción 1.8 y 1.9), o bien, por generación de metano (reacción 1.10)



Por lo tanto, el principal objetivo y desafío para la investigación y desarrollo de la producción de bio-hidrógeno, se enfoca esencialmente en el logro de mayores producciones, evitando su consumo durante el bioproceso.

1.4.2 PRINCIPALES ENZIMAS

Aunque algunas observaciones sobre la producción de bio-hidrógeno mediante micro algas y bacterias se remontan más de 200 años (Jackson y Ellms, 1896), la investigación fundamental en este campo comenzó a finales de los años 1920 con la producción microbiológica de hidrógeno (Strickland, 1929) y en los años 1940 con la producción de bio-hidrógeno mediante micro algas (Gaffron y Rubin, 1942), mientras que la investigación y desarrollo aplicado comenzaron a principios de los años 1970.

Los procesos de producción bio-hidrógeno dependen fundamentalmente de la presencia de al menos una de las dos enzimas productoras de hidrógeno: nitrogenasas e hidrogenasas (Loubette y Junker, 2006). Las enzimas nitrogenasas se encuentran distribuidas principalmente en microorganismos productores de hidrógeno por fotosíntesis, mientras que las enzimas



hidrogenasas se encuentran presentes en las bacterias productoras de hidrógeno por fermentación.

Las enzimas nitrogenasas, producen hidrógeno como subproducto de la fijación del nitrógeno. La enzima nitrogenasa está presente en una gran cantidad de microorganismos fijadores de nitrógeno, puede producir hidrógeno en una reacción irreversible de forma continua, incluso con saturación de producto, i. e. atmósfera al 100% de H₂ (Bedoya et al., 2008).

Para mantener la reacción de fijación del nitrógeno en la dirección deseada, la nitrogenasa produce hidrógeno en exceso, el cual se propaga fuera de la célula. En cada ciclo, el MgATP acompleja a la Fe-proteína con la MoFe-proteína. Se hidrolizan 2 ATP con la transferencia de un electrón a la MoFe-proteína y el complejo se disocia. En ausencia de otros sustratos, la nitrogenasa sigue funcionando reduciendo protones a hidrógeno. Esta es la base para la producción de hidrógeno en los sistemas basados en la enzima nitrogenasa. Sin embargo, su funcionamiento es sumamente lento (6.4 s⁻¹), haciendo necesario la biosíntesis de enormes cantidades de ambas proteínas. (Kovács et al., 2004, 2006)

Por otra parte, la enzima hidrogenasa ha estado en investigación desde los años 1930 (Stephenson y Strickland, 1931). Esta enzima resulta sorprendentemente compleja, considerando que realiza una de las reacciones químicas más simples: $2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$ (Das et al., 2006). Sus centros metálicos son sensibles al oxígeno, consecuentemente varias enzimas hidrogenasas son sensibles al oxígeno e irreversiblemente destruidas por exposición al mismo.

Todas las enzimas hidrogenasas conocidas tienen centros metálicos como sitios activos y las enzimas activas se sintetizan en procesos complejos que involucran enzimas auxiliares y etapas de maduración de proteínas. Existen cuatro enzimas hidrogenasas que realizan esta reacción: la Ni-Fe-Se-hidrogenasa, la Ni-Fe-hidrogenasa, la Fe-hidrogenasa y la hidrogenasa libre de metales, cuyas características se resumen en la Tabla 1.2. (Hallenbeck y Benemann, 2002; Hallenbeck, 2005; Das et al., 2006; Gutekunst et al., 2006)

Las Fe-hidrogenasas funcionan principalmente en el sentido de la producción de hidrógeno. Estas enzimas presentan una buena afinidad hacia las moléculas hidrófóbicas gaseosas, como el hidrógeno, debido a la configuración de sus centros activos (Peters et al., 1998). Las cinéticas enzimáticas están comprendidas entre 6000 y 9000 s⁻¹, lo cual se traduce en una alta



especificidad de la reacción (Melis y Melnicki, 2006). Debido a que la actividad de las enzimas hidrogenasas es 1000 veces mayor que la actividad de las enzimas nitrogenasas, resulta más adecuado el uso de los microorganismos fermentativos para la producción de hidrógeno.

Tabla 1.2. Clasificación de las enzimas hidrogenasas.

Clasificación	Ocurrencia / fuente	Función
Fe-Hidrogenasa	Bacterias fotosintéticas, bacterias anaerobias fermentativas, cianobacterias, algas verdes, protozoarios	Producción de hidrógeno
Ni-Fe-Se-Hidrogenasa	Bacterias sulfato reductoras, arqueas metanogénicas	Oxidación de hidrógeno
Ni-Fe- Hidrogenasa	Bacterias anaerobias, bacterias fotosintéticas, cianobacterias	Absorción de hidrógeno
Hidrogenasa libre de metales	Microorganismos metanogénicos	Formación de hidrógeno

Fuente: Das et al., 2006.

Dada la importancia que tienen estas enzimas en la producción de hidrógeno, es posible suponer que la cantidad o la actividad inherente de estas enzimas pudieran limitar todo el proceso; sin embargo, aun cuando la actividad catalítica de estas enzimas difiere enormemente, no hay evidencias para determinar que la cantidad de enzimas productoras de hidrógeno sea el factor limitante en cualquier sistema actualmente en estudio.

1.4.3 TIPOS DE INÓCULO EMPLEADOS

1.4.3.1 CULTIVOS PUROS

Las bacterias del género *Clostridium* (Taguchi et al., 1995, 1996; Chin et al., 2003; Wang et al., 2003a; Collet et al., 2004; Chen et al., 2005; Levin et al., 2006; Zhang et al., 2006a), *Enterobacter* (Tanisho et al., 1983, 1987; Yokoi et al., 1995; Kumar y Das, 2000, 2001; Fabiano y Perego, 2002; Ogino et al., 2005, Jo et al., 2008) y *Escherichia coli* (Bisaillon et al., 2006; Turcot et al., 2008) son las más frecuentemente encontradas en el inóculo para la producción de bio-hidrógeno.



El máximo rendimiento posible de la producción de hidrógeno (4 mol H₂/mol glucosa) se obtiene en las fermentaciones que tiene como principal metabolito soluble al ácido acético. No obstante, cuando se emplea bacterias del género *Clostridium* se obtienen fermentaciones ácido mixtas, por lo que el rendimiento está en función de la distribución de los metabolitos solubles producidos (Reith et al., 2003).

En los estudios relacionados con la producción de hidrógeno con cultivos puros se han utilizado bacterias del tipo *C. butyricum*, *C. acetobutyricum* y *C. pasteurianum*. La capacidad de las bacterias del género *Clostridium* para producir hidrógeno es bastante buena. No obstante, el rendimiento y la tasa de producción del hidrógeno se deben mejorar mediante la correcta selección de los parámetros operacionales (Reith et al., 2003). En los procesos en continuo, las máximas tasas de producción de hidrógeno reportadas se encuentran en el rango de 20 a 60 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹ con rendimientos de alrededor de 1.4 – 2.0 mol H₂/mol glucosa. Aunque se han obtenido rendimientos de 2.4 mol H₂/mol glucosa con velocidades de producción de 7 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹ (Taguchi et al., 1995).

En el caso de la bacteria *Enterobacter*, además de tener una alta tasa de crecimiento, la producción de hidrógeno no se ve inhibida a altas presiones de parciales de hidrógeno (Tanisho et al., 1987). Sin embargo, el rendimiento de la producción de hidrógeno es menor en comparación con el reportado para las bacterias del tipo *Clostridium*. Se ha demostrado que purgando el medio de cultivo con argón, el rendimiento de la producción de hidrógeno se incrementó a 1.6 mol H₂/mol glucosa, lo cual se atribuyó a la remoción del dióxido de carbono (Tanisho et al., 1998).

La bacteria *E. coli* es capaz de producir hidrógeno y CO₂ a partir del formiato en ausencia de oxígeno (Reith et al., 2003). Esta bacteria también es capaz de producir hidrógeno a partir de la transformación de los carbohidratos, alcanzando rendimientos de 2 mol H₂/mol glucosa (Turcot et al., 2008). Las productividades reportadas varían entre 30 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹ (para las células libres) y 50 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹ para las células inmovilizadas.

1.4.3.2 CONSORCIOS MICROBIANOS

Aunque se ha evaluado el empleo de cultivos puros para la producción de bio-hidrógeno, su empleo a gran escala puede resultar poco factible debido a la necesidad de esterilizar el sustrato para evitar que el cultivo se contamine. Para que la comercialización del bio-hidrógeno



se pueda llevar a cabo a gran escala, es necesario trabajar con sustratos no estériles asegurando que la producción del bio-hidrógeno se pueda llevar a cabo bajo las condiciones operacionales establecidas.

Se recurre al uso de consorcios microbianos debido a que es posible que estas comunidades microbianas complejas tengan una serie de actividades hidrolíticas necesarias para la degradación del sustrato, además de ser potencialmente más robustas para los cambios en las condiciones de operación (Li y Fang, 2007a; Wang y Wan, 2008c). Sin embargo, una de las principales desventajas con este tipo de inóculo es la presencia de microorganismos consumidores de hidrógeno (e. g. bacterias productoras de ácido propiónico, arqueas metanogénicas, bacterias acetogénicas).

Hasta ahora, las principales fuentes de inóculo empleadas para la producción de hidrógeno se han obtenido de los biorreactores metanogénicos ya existentes (Kotsopoulos et al., 2006; Hu y Chen, 2008). Esto implica que el inóculo tenga una alta actividad metanogénica (McLeod et al., 1990), lo cual se puede traducir en una alta actividad consumidora de hidrógeno. Para solucionar este problema se han desarrollado diferentes métodos de obtención del inóculo productor de hidrógeno, los cuales se explican a continuación.

1.4.3.3 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DEL INÓCULO

Los métodos de obtención del inóculo productor de hidrógeno se basan en el empleo de algún tratamiento para enriquecer a las bacterias productoras de hidrógeno en los cultivos mixtos. Estos tratamientos incluyen, principalmente, el choque térmico (Wang y Wan, 2008a), el uso de ácidos o bases fuertes (Cheong y Hansen, 2006), la aireación (Zhu y Beland, 2006), la esterilización (Guo et al., 2008a), la sonicación (Guo et al., 2008a), la aplicación de cloroformo (Hu y Chen, 2007), el uso de 2-bromoetanosulfonato de sodio o ácido 2-bromoetanosulfúrico (Mohan et al., 2008; Zhu y Beland, 2006) y/o el uso del yodopropano (Wang y Wan, 2008a).

Algunos de estos métodos se basan en la premisa de que las bacterias productoras de hidrógeno (principalmente las del género *Clostridium*) son capaces de esporular bajo condiciones ambientales adversas (e. g. alta temperatura, acidez y alcalinidad extremas) y pueden reactivarse cuando se les proporcionan las condiciones adecuadas para su desarrollo (Wang et al., 2011), mientras que los microorganismos metanogénicos no tienen dicha capacidad (Mohan, 2008). En el caso de los tratamientos con sustancias químicas (como el 2-



bromoetanosulfonato de sodio o el iodopropano), estos actúan inhibiendo la actividad de la metil-coenzima reductasa M, la cual es un componente clave en la metanogénesis (Ye et al., 1999).

Debido a que cada tratamiento tiene características particulares no es posible determinar que método de obtención del inóculo es el mejor. Sin embargo, se ha observado una mejoría en el desempeño del sistema de producción de bio-hidrógeno después de aplicar algún tratamiento (Yu et al., 2002; Wang y Wan, 2009). Lo cual se debió, principalmente, a la inhibición de la actividad consumidora de hidrógeno en los microorganismos presentes en el inóculo.

Aunque los métodos de obtención del inóculo permiten controlar la actividad de aquellos microorganismos consumidores de hidrógeno, se ha observado que algunos de ellos pueden afectar la estructura de la comunidad microbiana (Shin et al., 2004; Kim y Shin, 2008; Abreu et al., 2011). A pesar de que el uso de este tipo de metodologías a escala laboratorio ha resultado eficaz para controlar el consumo de hidrógeno por los microorganismos metanogénicos presentes en el inóculo, su uso a gran escala puede resultar limitativo y poco práctico (Shizas y Bagley, 2005).

Además, este tipo de metodologías pueden ser poco eficaces para inactivar a las bacterias no productoras de hidrógeno, tales como las bacterias productoras de ácido láctico y ácido propiónico, las cuales compiten por el sustrato y pueden reducir la producción de bio-hidrógeno (Jung et al., 2011). Por lo tanto, resulta necesario el desarrollo de una metodología que permita obtener un inóculo productor de hidrógeno de manera más práctica y que permita controlar la actividad consumidora de hidrógeno del inóculo empleado.

1.5 BIORREACTORES EMPLEADOS EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

Los estudios relacionados con la producción de bio-hidrógeno reportados en la literatura han empleado tanto reactores basados en células suspendidas (e. g. biomasa de crecimiento disperso, flóculos) como reactores con células inmovilizadas (e. g. biopelículas, gránulos). El uso de agregados microbianos, tales como los flóculos y las biopelículas, han sido muy útiles en la biotecnología debido a que es más fácil su separación mediante sedimentación o filtración de la mezcla sólido-líquido en comparación con las células de crecimiento disperso (Nicoella et al., 2000).



El término flóculo se utiliza para referirse a un conjunto de células individuales y microcolonias que ocurren bajo condiciones específicas de operación del reactor o después de la adición de diversos agentes al medio (Boonaert et al., 1999). Una biopelícula se puede definir como una estructura compleja de células y productos celulares, como los polímeros extracelulares (Characklis, 1990), los cuales pueden formar gránulos densos (Lettinga et al., 1980), o pueden crecer adheridas a una superficie estática sólida (biopelículas estáticas) o a soportes suspendidos (biopelículas soportadas).

Dentro de los biorreactores frecuentemente empleados para la producción de hidrógeno se encuentra el biorreactor de tanque continuamente agitado (CSTR por sus siglas en inglés), el biorreactor de lecho de lodos con flujo ascendente (UASB por sus siglas en inglés) y el biorreactor de lecho fijo o empacado.

El biorreactor CSTR es un sistema representativo de los reactores a base de células suspendidas. Este tipo de reactor se ha empleado frecuentemente para la producción de biohidrógeno debido a que su configuración y modo de operación favorecen a los fenómenos de transferencia de masa, lo cual ha permitido obtener buenos resultados respecto a la producción de biohidrógeno. Sin embargo, su principal desventaja consiste en que no son capaces de desacoplar el tiempo de residencia hidráulica (TRH) del tiempo de retención de sólidos (TRS), por lo que a un TRH menor de 8 h la biomasa se lava del biorreactor, disminuyendo consigo la eficiencia del proceso productor de hidrógeno (Oh et al., 2004; Lee et al., 2007, 2009).

Los biorreactores de lecho fijo o empacado se operan bajo condiciones de turbulencia hidráulica menores por lo que los microorganismos tienen una mayor resistencia a la transferencia de masa, lo cual resulta en menores tasas de conversión del sustrato y baja producción de hidrógeno (Show et al., 2000). Debido a la formación de gradientes de pH a lo largo de la columna empacada resulta difícil mantener altos rendimientos de la producción de hidrógeno a pesar de que el pH se mantenga controlado (Rachman et al., 1998)

Se ha señalado que durante la etapa de sedimentación de un biorreactor discontinuo secuencial (SBR por sus siglas en inglés) se pueden obtener dos tipos de biomasa, la biomasa que sedimenta (y que permanece dentro del reactor) y la que no sedimenta (y que se desecha junto con el efluente del reactor). Arooj et al. (2007) encontraron que la biomasa que no sedimenta y que permaneció en suspensión presenta una actividad específica de producción de



bio-hidrógeno mayor que la biomasa que sedimentó. Este hallazgo tiene fuertes implicaciones al momento de seleccionar y arrancar el biorreactor productor de hidrógeno, ya que si no se retiene esta biomasa dentro del reactor, se podría afectar considerablemente la producción de bio-hidrógeno.

La operación exitosa de cualquier biorreactor productor de hidrógeno depende del desempeño de los microorganismos presentes en el sistema. La retención de la biomasa es un aspecto muy importante cuando se realiza la selección del biorreactor a emplear debido a que, en general, las bacterias anaerobias crecen lentamente (Vallero et al., 2005).

Frecuentemente resulta necesario emplear un biorreactor cuya configuración desacople el TRH del TRS, con la finalidad de mantener una relación TRS/TRH alta y se pueda prevenir el lavado de las bacterias de lento crecimiento. Lo anterior también permite incrementar la carga orgánica y reducir las dimensiones del biorreactor, lo cual disminuiría los costos de construcción (Khanal, 2008).

La independencia del TRH del TRS, mediante auto-segregación (como en el caso de los lodos granulares) o la formación biopelículas, es esencial para la operación adecuada de los biorreactores anaerobios de alta tasa (Lettinga et al., 1980). Un sistema de inmovilización celular podría presentar un alto consumo de sustrato, lo cual podría conducir a una alta producción de hidrógeno a un TRH menor (Chang y Lin, 2004; Lee et al., 2004, 2006).

El biorreactor UASB no sólo se ha empleado para producción de metano, sino también para la producción de hidrógeno (Chang y Lin, 2004). Sus principales características son la cama de lodo granular, la independencia del TRH del TRS y su capacidad para trabajar a altas cargas orgánicas (Lettinga et al., 1980). Su principal desventaja radica en que la cama de lodo granular se puede formar después de varios meses de puesta en marcha del biorreactor, por lo que frecuentemente se utiliza un inóculo proveniente de otro biorreactor para acelerar el proceso (Tchobanoglous et al., 2003). Otra de sus desventajas se relaciona con la posibilidad de disgregar a los gránulos, ya que al romperlos es posible que la biomasa de llegue a desechar del reactor.

La turbulencia natural causada por el ascenso de las burbujas de gas liberadas por los gránulos proporciona un contacto eficiente entre la biomasa y el agua residual. Debido a esto,



no se requiere el empleo de una agitación mecánica por lo que se reduce la demanda energética y sus costos asociados. Por otra parte, Gavala et al. (2006) mostraron que el biorreactor UASB es más estable que el biorreactor CSTR respecto a la producción de hidrógeno, consumo de glucosa y productos microbianos (e. g. AGV, alcoholes) a TRH entre 2 y 12 h. Aún más, estos autores observaron que la tasa de producción de hidrógeno en el biorreactor UASB fue significativamente mayor que la obtenida en el biorreactor CSTR (19.05 y 8.42 mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹, respectivamente) a un TRH de 2 h, debido, principalmente, a la retención de la biomasa en el biorreactor UASB.

La retención de las células suspendidas en los biorreactores que emplean la tecnología de membranas puede proporcionar una mejora significativa en la producción de bio-hidrógeno (Oh et al., 2004). Además, los biorreactores con membranas ofrecen un grado de libertad adicional para el control del proceso, debido a que el TRS es independiente del TRH (Drews y Kraume, 2002).

En comparación con los biorreactores CSTR, los biorreactores con membranas presentan ventajas para la producción de hidrógeno cuando su operación se realiza bajo condiciones de TRH cortos (Oh et al., 2004) o bajo condiciones cercanas a la sobrecarga del biorreactor (Shen et al., 2009). Esto se ha atribuido a que los biorreactores con membranas son capaces de retener la biomasa bajo dichas condiciones de operación. Liang et al. (2002) observaron que la tasa de producción de hidrógeno aumentó de 2.6 mmol-H₂ g-SSV⁻¹ h⁻¹, sin el empleo de membranas, a 3.0 mmol-H₂ g-SSV⁻¹ h⁻¹ con el empleo de membranas, mientras que el rendimiento de la producción de hidrógeno aumentó de 4.68 a 5.14 mmol H₂/g glucosa.

1.5.1 BIORREACTORES CON MEMBRANAS

De acuerdo a la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC por sus siglas en inglés) un biorreactor con membranas es un dispositivo en el cual se lleva a cabo de manera simultánea una reacción y una separación basada en una membrana dentro del mismo sistema físico (Koros et al., 1996).

El espectro de separación de las membranas (Figura 1.2) va desde la ósmosis inversa y la nanofiltración, para la remoción de solutos, hasta la ultrafiltración y micro filtración, para la remoción de partículas finas. Debido a esto, es posible retener a los microorganismos que se lavarían en otro tipo de biorreactores (Ben Aim y Semmens, 2002; Jeison, 2007).

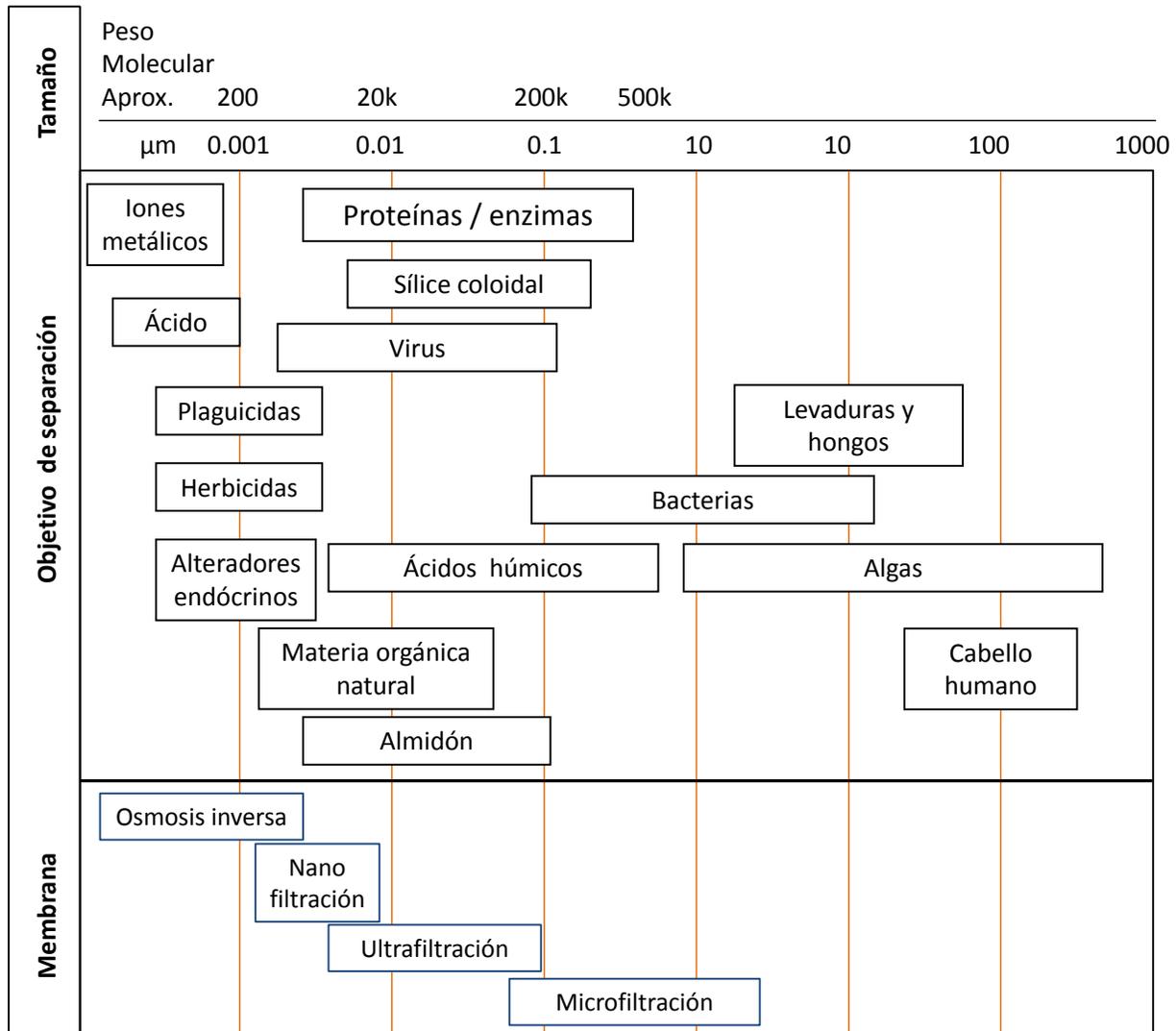


Figura 1.2. Espectro de separación de las membranas.

Fuente: Adaptado de Hai y Yamamoto (2011).

Las ventajas de los biorreactores con membranas sobre los procesos anaerobios convencionales incluyen el manejo de altas concentraciones de biomasa en el biorreactor lo que puede resultar en altas tasas de remoción de sólidos y materia orgánica, reducción del volumen del biorreactor, baja producción de lodo debido a la declinación de la biomasa en el reactor y obtención de un efluente de alta calidad debido a la remoción de sólidos por la membrana. (Cicek et al., 1998; Defrance y Jaffrin, 1999; Oh et al., 2004; Jaison, 2007; Judd, 2008)



Las principales limitaciones de esta tecnología están relacionadas con los altos costos de inversión para la adquisición de la membrana, la colmatación de la membrana y los costos de operación debido a la energía requerida (principalmente para el caso de membranas externas). (Al-Malack y Anderson, 1997; Lee et al., 2001a; Khanal, 2008)

Las membranas se pueden usar mediante las siguientes configuraciones (Figura 1.3): como un módulo externo reciclando la biomasa constantemente (membrana externa) (Brockmann y Seyfried, 1996) o con la membrana sumergida (Hu y Stuckey, 2006).

En los biorreactores con membrana externa, los módulos de las membranas se colocan fuera del reactor y el licor mezclado se recircula a través de la membrana. En la filtración con membranas externas, el fluido pasa de manera tangencial a la membrana estableciendo un diferencial de presión a través de la misma. Esto hace que algunas de las partículas pasen a través de la membrana. Las partículas restantes continúan fluyendo a través de la membrana haciendo menos susceptible la formación de una torta adherida a su superficie.

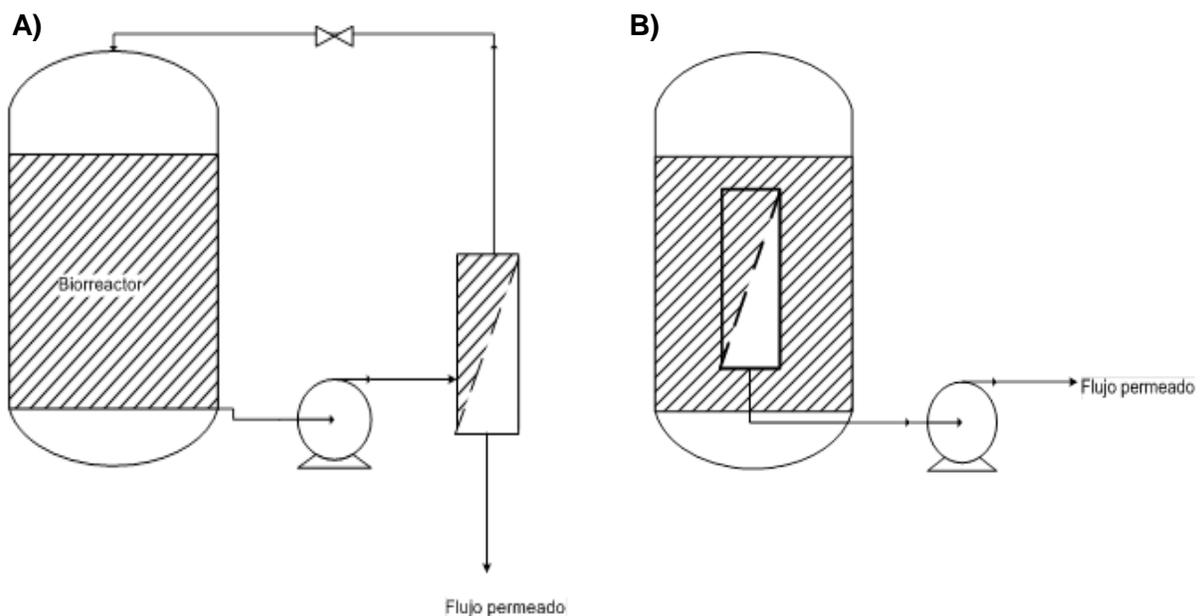


Figura 1.3. Arreglos típicos de los biorreactores con membranas. A) Membrana externa y B) membrana sumergida.

La demanda energética de los biorreactores con membrana externa es alta debido a las grandes presiones de operación y a los altos flujos volumétricos requeridos para alcanzar la velocidad de cruce requerida a través de la membrana. En estos sistemas las necesidades de



bombeo contribuyen con el 60-80% del consumo total de energía (Gander et al., 2000). Se considera que el uso de las membranas externas es más adecuado para las aguas residuales caracterizadas por alta temperatura, pH extremo, alta toxicidad y/o baja filtrabilidad (Yang et al., 2006). A pesar de que la mayoría de las investigaciones realizadas empleando biorreactores anaerobios con membranas se han llevado a cabo con el arreglo de membranas externas, el potencial efecto negativo de la circulación del licor mezclado a través de la membrana, de las bombas y de las válvulas ha generado preocupación (Yang et al., 2006).

En los biorreactores con membranas sumergidas, éstas se colocan sumergidas en el licor mezclado dentro del biorreactor o en un compartimiento exterior. En esta configuración, el fluido pasa a través de la membrana debido a la succión que se ejerce sobre ella. Las partículas más grandes que el tamaño de los poros de la membrana quedan retenidas en su superficie. Esto significa que las partículas atrapadas comienzan a construir una torta en la superficie de la membrana la cual reduce la eficiencia del proceso de filtración hasta que la torta se retira de la membrana.

El empleo de biorreactores con membrana sumergida involucra bajas necesidades energéticas, en comparación con los biorreactores con membrana externa. Sin embargo, operan a flujos permeados menores debido a que proporcionan bajos niveles de superficie de corte, es decir, se requieren grandes superficies de membrana. El acoplamiento de la membrana dentro del biorreactor previene el lavado de los microorganismos de lento crecimiento. Cuando se compara a los biorreactores con membranas externas o convencionales contra los de membranas sumergidas, éstos últimos presentan ventajas significativas tales como: huella ambiental pequeña, menor manejo de lodos, menos exigencia de ayuda por parte del operador y menor consumo de energía. (Al-Malack, 2007)

1.5.2 BIORREACTORES CON MEMBRANA A BASE DE LODO GRANULAR

Tanto la cantidad como las características físicas de los microorganismos determinan las propiedades físicas del lodo, e. g. la reología y el tamaño de partícula (Jaison et al., 2009), lo cual influye en el proceso de colmatación de la membrana. Debido a esto, se ha propuesto el uso de lodo granular como una alternativa para controlar la colmatación de la membrana (Li et al., 2005).



La granulación de los microorganismos es un proceso complejo el cual involucra diversas interacciones fisicoquímicas y microbiológicas. La formación de gránulos microbianos es uno de los factores clave en el tratamiento de aguas residuales y ha mostrado avances tanto en el proceso metanogénico (Pol et al., 2004) como en el proceso de acidogénesis para la producción de hidrógeno (Zhang et al., 2007a, 2007b).

Los gránulos microbianos presentan diversas ventajas sobre los flóculos microbianos convencionales, tales como una estructura más densa, mejor sedimentabilidad, mayor concentración de biomasa y pueden resistir diversos efectos tóxicos ocasionados por contaminantes orgánicos e inorgánicos (Liu et al., 2002; Pol et al., 2004; Liang et al., 2010).

La formación y los mecanismos de la granulación del lodo anaerobio en los biorreactores de lecho de lodos con flujo ascendente (UASB por sus siglas en inglés) está bien documentada (Liu et al., 2002). La granulación es un proceso complejo que involucra interacciones hidrodinámicas, fisicoquímicas, mecánicas y microbiológicas. McLeod et al. (1990) sugirieron que, durante el proceso de granulación de la biomasa, la *Methanosaeta* funciona como centro de adherencia para iniciar el desarrollo de los gránulos anaerobios durante la degradación de la sacarosa (Figura 1.4).

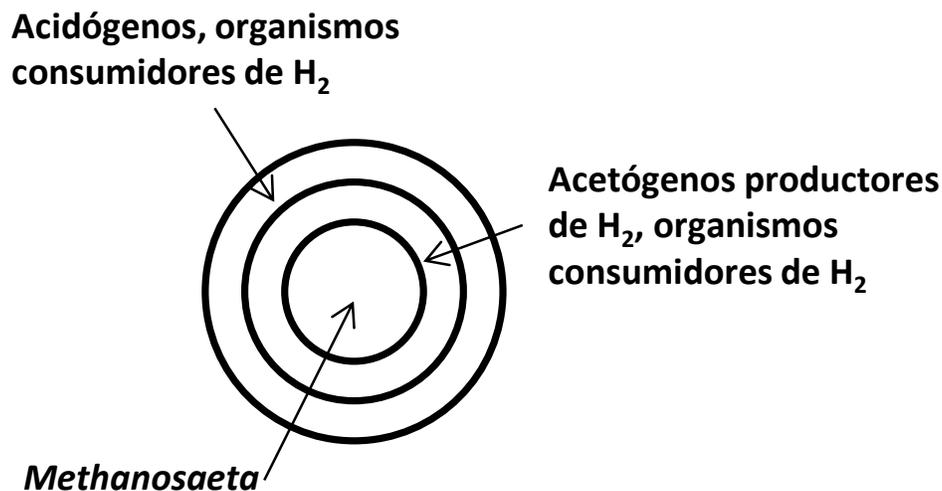


Figura 1. 4. Distribución de los microorganismos en un gránulo anaerobio.

Fuente: McLeod et al., 1990.



Las bacterias productoras de acetato, incluyendo a las bacterias acetógenas productoras de hidrógeno, se agregarían proporcionando el sustrato para la *Methanosaeta* y, junto con los organismos consumidores de hidrógeno, formarían una segunda capa alrededor del núcleo o centro del gránulo. Las bacterias fermentativas se adhieren a este conjunto de microorganismos formando la capa exterior del gránulo, donde están en contacto con el sustrato presente en el influente. Entonces, los productos de las bacterias fermentativas servirían como sustrato para las bacterias acetógenas subyacentes. Así, este arreglo espacial de los diferentes grupos tróficos conlleva un alto nivel de actividad metabólica. (McLeod et al., 1990)

El uso de biorreactores con membranas inoculados con lodo granular, en condiciones anaerobias, se ha reportado para el tratamiento de aguas residuales domésticas (Chu et al., 2005a, 2005b) así como para el tratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios (Bohdziewicz, 2008). En la literatura, los estudios relacionados con la producción de bio-hidrógeno han empleado tanto biorreactores con membranas externas (Oh et al., 2004; Lee et al., 2007) como en biorreactores con membranas sumergida (Lee et al., 2008a, 2009a, 2009b, 2010; Shen et al., 2009, 2010; Kim et al., 2011). En ambos casos los biorreactores se han trabajado con lodo de crecimiento disperso o flocular. No obstante, hasta el momento, no se ha reportado el uso combinado de lodo granular con membranas para la producción de bio-hidrógeno.

1.5.3 MECANISMOS DE COLMATACIÓN DE LAS MEMBRANAS

De acuerdo a la IUPAC la colmatación de la membrana es el proceso resultante de la pérdida del desempeño de la membrana debido a la deposición o adsorción de sustancias suspendidas o solutos sobre su superficie o dentro de los poros (Koros et al., 1996). Todos los parámetros involucrados en el diseño y operación del proceso con membranas influyen sobre el proceso de colmatación (Figura 1.5). Dichos parámetros se pueden clasificar en: características de la membrana, e. g. tamaño y distribución del poro, configuración de la membrana, hidrofobicidad, material de fabricación; características del licor mezclado, e. g. tamaño de la biomasa, características de los flóculos, concentración de sólidos en el licor mezclado, hidrofobicidad, exopolímeros celulares (EPS por sus siglas en inglés), entre otros; condiciones de operación, e. g. TRH, TCO, operación en estado no estacionario, empleo de retrolavados, etc.

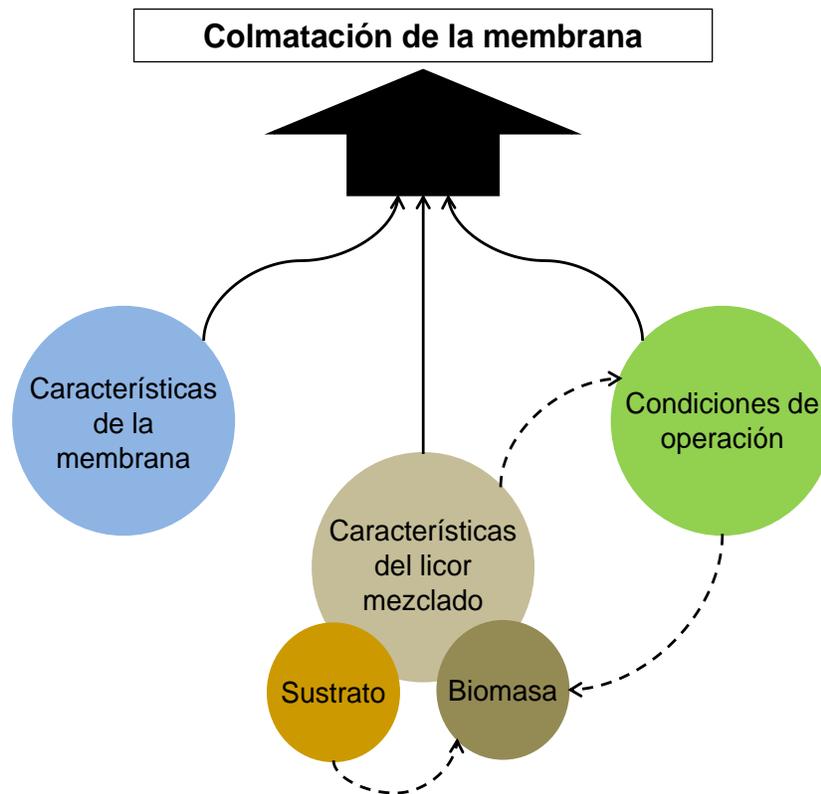


Figura 1.5. Interrelaciones de los parámetros que influyen en la colmatación de la membrana.

Fuente: Adaptado de Hai y Yamamoto, 2011.

La bio-colmatación se refiere a la deposición, crecimiento y metabolismo de las células bacterianas o flóculos sobre la membrana. Este proceso puede comenzar con la deposición de una célula o un conjunto de ellas sobre la superficie de la membrana. Posteriormente, las células se multiplican y forman una biotorta. La formación de la biotorta, la cual se puede describir como un medio poroso con un sistema complejo de partículas interconectadas, resulta del balance de la fuerza cortante en la pared de la membrana y la fuerza debida a la filtración, y está ligada a las características de la biomasa. Se ha reportado que la formación de la biotorta es el principal responsable de la colmatación de las membranas (Jaison y van Lier, 2007).

La colmatación orgánica de las membranas se refiere a la deposición de biopolímeros en la membrana. Debido a su tamaño pequeño, los biopolímeros solubles pueden depositarse sobre las membranas más fácilmente, pero tienen una velocidad de transporte menor en comparación con las partículas más grandes. Durante la filtración, los coloides, solutos y células microbianas pasan y se depositan dentro de los poros de las membranas. Sin embargo, conforme pasa el



tiempo, las células depositadas se multiplican y producen EPS que taponan los poros y forman una capa fuertemente adherida al mismo. (Meng et al., 2009)

Los elementos inorgánicos, tales como el Mg, Al, Fe, Ca, Si, etc., y los metales pueden aumentar la biocolmatación y la colmatación orgánica, las cuales pueden llegar a formar una capa recalcitrante. La colmatación inorgánica se puede deber a la concentración/polarización de los elementos inorgánicos y los metales, lo que permite que se precipiten químicamente y queden atrapados dentro de una capa de biopolímero (Meng et al., 2009). La colmatación ocasionada por este fenómeno no es fácil de remover, incluso mediante un lavado químico (Hai y Yamamoto, 2011).

1.5.4 MODELADO DEL FLUX Y LA RESISTENCIA DE LA MEMBRANA

La reducción del flujo permeado o flux (J), por su nombre en inglés, es un fenómeno inevitable y es el parámetro más importante en los procesos con membranas. La reducción del flux está fuertemente relacionada con la colmatación de la membrana debido a la reducción del área de filtrado. Generalmente el fenómeno de reducción del flux se analiza en términos de la resistencia a la filtración. De acuerdo a la Ley de Darcy, el flux a través de la membrana es función de la variación de la presión transmembrana (PTM), la viscosidad del líquido permeado y la resistencia total (Judd, 2008)

$$J = \frac{\Delta PTM}{\mu R_T} \quad (1.11)$$

Donde J representa al flux aplicado, ΔPTM es la variación de la presión con la cual el fluido atraviesa la membrana, μ es la viscosidad dinámica del fluido y R_T es la resistencia total de la membrana, la cual se puede dividir en resistencias parciales de acuerdo al modelo de resistencias en serie (Oh et al., 2004)

$$R_T = R_m + R_c + R_p \quad (1.12)$$

En donde R_m es la resistencia intrínseca de la membrana, R_c es la resistencia debida a la formación de la biotorta sobre la membrana y R_p es la resistencia debida a la reducción del diámetro o bloqueo de poros.



1.6 INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS OPERACIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE BIO-HIDRÓGENO

1.6.1 TEMPERATURA

La temperatura tiene un efecto importante sobre las propiedades fisicoquímicas de los componentes encontrados en la digestión anaerobia. Influye en la tasa de crecimiento y en el metabolismo de los microorganismos y, por tanto, en la dinámica poblacional del biorreactor. Asimismo, tiene un efecto significativo sobre la presión parcial del hidrógeno en los biorreactores, por lo que afecta a la cinética del metabolismo de las bacterias (Appels et al., 2008).

La temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en las actividades de las bacterias productoras de hidrógeno y en la velocidad de producción del hidrógeno (Das y Veziroglu, 2001). Se ha demostrado que en un rango apropiado, el incremento en la temperatura puede aumentar la capacidad de las bacterias productoras de hidrógeno para generar dicho gas, pero la temperatura en niveles mucho más altos puede disminuirlo (Das y Veziroglu, 2008; Wang y Wan, 2008b).

Aun cuando la temperatura óptima reportada no siempre fue la misma, esta varió en el rango mesofílico alrededor de los 35 °C a 37 °C, obteniendo producciones de bio-hidrógeno de 2.45 – 7.68 L-H₂ L⁻¹ d⁻¹ (Liang et al., 2002; Lee et al., 2007, 2009a, 2009b; Jeong et al., 2007, 2010). No obstante, los mejores resultados se obtuvieron cuando se empleó una temperatura de 35 ± 0.5 °C (Oh et al., 2004; Lee et al., 2008a, 2008b, 2010; Carbajal, 2009). Montes-Moncivais et al. (2007) determinaron que la temperatura óptima para la producción de hidrógeno es independiente del pH empleado.

El uso de temperaturas termofílicas (50 – 64 °C) tiene diversos beneficios, tales como el incremento de las tasas de reacción bioquímicas. Pero, también tiene efectos que contrarrestan dichas ventajas, ya que el aumento del pK_a de los AGV hace que el proceso sea más susceptible a la inhibición, por lo que el control de la temperatura es más sensible para los procesos termofílicos en comparación con los mesofílicos (Appels et al., 2008). Además, para que el balance entre la producción de bio-hidrógeno y la recuperación de energía sea favorable, resulta razonable la operación de los biorreactores productores de hidrógeno a una temperatura



mesofílica. Esto explica el hecho de que la mayoría de los estudios realizados para la producción de bio-hidrógeno se haya utilizado una temperatura dentro del rango de 35 – 37 °C.

1.6.2 pH

El pH influye en la actividad de la enzima hidrogenasa así como en la ruta metabólica de las bacterias presentes en el inóculo. Influye en la morfología y estructura de la célula, afectando con ello el proceso de floculación y los fenómenos de adherencia (Zhao y Yu, 2008). También influye en la selección de los microorganismos presentes en el sistema, e. g. las bacterias productoras de ácido propiónico y las arqueas metanogénicas, las cuales se ven afectadas a niveles de pH bajos (Wang et al., 2006; Zhou y Ren 2007).

El pH puede afectar la distribución de los metabolitos solubles y con ello el proceso de producción de bio-hidrógeno. Los ácidos grasos volátiles (AGV) producidos durante la digestión tienden a acidificar el medio. La reducción del pH normalmente se contrarresta mediante la actividad de las arqueas metanogénicas, las cuales pueden aumentar la alcalinidad del medio a través del dióxido de carbono, el amoníaco y el bicarbonato (Appels et al., 2008). El pH del sistema está influenciado por la concentración de dióxido de carbono en la fase gaseosa y por la alcalinidad de bicarbonatos (HCO_3^-) en la fase líquida. Cuando la concentración del dióxido de carbono en la fase gaseosa permanece constante, la adición de carbonatos puede aumentar el pH del biorreactor. (Appels et al., 2008)

Es normal que durante la producción de bio-hidrógeno se produzcan AGV, los cuales pueden tener diferentes efectos en función de su concentración. La parte no disociada de los AGV puede permearse libremente a través de la membrana celular lo cual puede perturbar el balance fisiológico de la célula. Para restablecer éste balance se tiene que emplear energía, reduciendo su disponibilidad para que las bacterias puedan crecer. Esto inhibe, de cierto modo, el crecimiento de los microorganismos y con ello la producción de biogás (Wang et al., 2008). Si la velocidad de producción de bio-hidrógeno es menor que la de la producción de AGV, alcanzando niveles inhibitorios, se reduce simultáneamente la capacidad búfer del medio, por lo que los microorganismos productores de hidrógeno no podrían adaptarse al cambio tan rápido del ambiente y podrían llegar a inhibirse (Khanal et al., 2004).

Cuando la población microbiana alcanza el estado estacionario, la reacción puede cambiar de la fase de producción de hidrógeno y AGV a la fase de producción de solventes. Este



cambio se da cuando el pH disminuye a valores menores de 4.5 (Khanal et al., 2004), debido al incremento de los AGV durante la fase de crecimiento exponencial, así como a niveles de pH mayores de 5.7 debido a la síntesis o a la activación de las enzimas necesarias para la producción de solventes (Gottwald y Gottschalk, 1985). Por lo tanto, si el pH no se mantiene en un rango adecuado, se puede inhibir la producción de bio-hidrógeno o, incluso, se puede provocar un cambio en la población microbiana causando el cese de producción de hidrógeno.

Fang et al. (2002a) demostraron que el pH óptimo para la producción de hidrógeno a partir de la degradación de la glucosa es de 5.5, específicamente porque a éste pH el rendimiento de la producción de bio-hidrógeno se incrementó. Debido a esto, en la mayoría de las investigaciones sobre la producción de bio-hidrógeno se han empleado valores de pH en el rango de 5.5 ± 0.05 , obteniendo rendimientos de la producción de hidrógeno mayores a 1.5 mol H_2 /mol glucosa (Kim et al., 2006a, 2006b; Hafez et al., 2010; Lee et al., 2007, 2009b, 2010; Zhao y Yu, 2008).

Sin embargo, debe tomarse en cuenta que para definir un pH óptimo éste también depende de la especie microbiológica dominante en el sistema. Así, el pH óptimo estará entre 4.5 y 6.0 si la especie dominante en el sistema pertenece al género *Clostridium*. Si la especie dominante pertenece al género *Enterobacter* el pH óptimo estará en el rango de 6 a 6.5. Mientras que para las bacterias del tipo *Thermoanaerobacterium* el pH óptimo estará entre 6 y 7 (Bartacek et al., 2007). A pesar de que la producción de bio-hidrógeno es factible dentro del rango de pH de 4.5 a 7 hay pocos estudios que se han realizado a niveles de pH inferiores a 5 (Kim et al., 2012).

1.6.3 TASA DE CARGA ORGÁNICA

Para optimizar un sistema para la producción de bio-hidrógeno, es esencial definir un rango de tasas de carga orgánica (TCO) que el sistema pueda manejar con eficiencia, o una TCO óptima que permita obtener una producción máxima de bio-hidrógeno. Se sabe que la TCO óptima depende no sólo del tipo de biorreactor e inóculo empleado, sino que también depende del tipo de sustrato utilizado. Para el caso de la melaza y lodo anaerobio se ha reportado una tasa de producción específica de hidrógeno de $140 \text{ mL-H}_2 \text{ g-SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$, mientras que para los residuos de la industria cervecera y estiércol de vaca como inóculo se obtuvo una tasa de $460 \text{ mL-H}_2 \text{ g-SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Buitrón y Carbajal, 2010).



De los resultados reportados en la literatura se observó que no hay una relación clara entre la producción de bio-hidrógeno y la TCO. Wu et al. (2006) obtuvieron un rendimiento máximo (1.6 mol H₂/mol glucosa) a una TCO de 120 g-DQO L⁻¹ d⁻¹, mientras que Kyazze et al. (2006) obtuvieron un rendimiento máximo (1.3 mol H₂/mol glucosa) a una TCO de 45 g-DQO L⁻¹ d⁻¹ siendo mayor en comparación con el obtenido por Wu et al. (2006) a la misma TCO, el cual fue de 0.9 mol H₂/mol glucosa.

Existe escasa información acerca del efecto de la TCO sobre la producción de hidrógeno en biorreactores con membranas. Shen et al. (2009) estudiaron la relación entre la TCO y la producción de bio-hidrógeno y determinaron que a una TCO de hasta 13 g-DQO L⁻¹ d⁻¹ el rendimiento de la producción de bio-hidrógeno no estuvo influida significativamente por la TCO. También observaron que a una TCO de 30 g-DQO L⁻¹ d⁻¹ el biorreactor se sobrecargó en relación a la utilización de la glucosa e incluso se alcanzaron rendimientos significativamente menores en comparación con la operación no sobrecargada.

1.6.4 TIEMPO DE RESIDENCIA HIDRÁULICA

El tiempo de residencia hidráulica (TRH) es un factor importante debido a que se puede emplear como un método de selección de la población microbiana presente en el biorreactor, de forma tal que se puede permitir que únicamente ciertos tipos de bacterias puedan permanecer en el interior del biorreactor. Se ha observado que a un TRH de 6 h las bacterias productoras de ácido propiónico (consumidoras de hidrógeno) se lavan del sistema debido a la selección hidrodinámica impuesta por el TRH (Hawkes et al., 2002; Zhang et al., 2006b).

El TRH puede afectar considerablemente a los procesos en continuo, debido a que de esta forma se puede llegar a lavar a las arqueas metanogénicas. Dado que la tasa de crecimiento de las bacterias productoras de hidrógeno (0.172 h⁻¹) es mayor que la tasa de crecimiento de las arqueas metanogénicas (0.017 – 0.02 h⁻¹), resulta necesario el empleo de TRH cortos con la finalidad de retardar, tanto como sea posible, el crecimiento de las bacterias consumidoras de hidrógeno. El uso de TRH cortos reduce el tamaño y el costo de construcción del biorreactor.

Hasta el momento, no se tiene un acuerdo sobre el TRH óptimo para los biorreactores productores de hidrógeno y la poca información con la que se cuenta presenta variaciones considerables. Para Zhang et al. (2007a) el TRH óptimo en un CSTR es de 0.5 h, mientras que para Arooj et al. (2008) el TRH óptimo en un CSTR es de 12 h.



Existe escasa información sobre el efecto que tiene el TRH en la producción de hidrógeno en los biorreactores con membrana, así como el valor de TRH óptimo. Para Kim et al. (2006c), trabajando con un biorreactor con membranas externas, el TRH óptimo es de 0.79 h. Oh et al. (2004) observaron que el TRH se pudo reducir a 3.3 h, incrementando la utilización de glucosa del 90% al 98%, aumentando también la tasa de producción de bio-hidrógeno en un 28%.

1.6.5 CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y FOSFATO

Se sabe que el nitrógeno es un componente muy importante para las proteínas, ácidos nucleicos y enzimas que son de gran importancia para el crecimiento de las bacterias productoras de hidrógeno (Lin y Lay, 2004; Wang y Wan, 2008d). El fosfato es necesario para la producción de hidrógeno debido a su valor nutritivo así como por su capacidad búfer.

La información reportada en la literatura indica que no hay un acuerdo sobre la concentración óptima del nitrógeno ni del fosfato en relación a la cantidad de carbono suministrado. Argun et al. (2008) indican que la relación óptima de C/N y C/P para la producción de hidrógeno es de 200 y 1000, respectivamente. O-Thong et al. (2008) reportan que la relación óptima de C/N y C/P es de 74 y 559, respectivamente. La dispersión de los valores reportados puede deberse a la diferencia entre las condiciones del sustrato y el rango de valores de la relación C/N y C/P estudiados.

1.6.6 CONCENTRACIÓN DEL HIERRO

Los iones metálicos pueden inhibir la actividad de las bacterias productoras de hidrógeno. No obstante, se requiere una cantidad traza para la producción de hidrógeno (Lee et al., 2001b; Li y Fang, 2007b).

El hierro es un elemento traza muy importante que sirve para mediar entre la hidrogenasa y la NADH. Una cantidad limitada de hierro, en un cultivo enriquecido dentro de un biorreactor con membranas, puede resultar insuficiente para mantener la actividad microbiana necesaria para la producción de hidrógeno. Bajo esta condición, también sería difícil para la hidrogenasa mediar la reacción reversible entre el hidrógeno y un donador de electrones como el ferredoxin reducido. Por lo que la cantidad de hierro presente en el sistema puede afectar la producción de bio-hidrógeno. Lee et al. (2009b), empleando un biorreactor con membranas sumergidas, determinaron que a una concentración de 10.9 mg-FeSO₄/L la producción de bio-hidrógeno fue



de 41.6 L/d, la cual fue 1.6 veces mayor que la obtenida a una concentración de hierro de 2.7 mg-FeSO₄/L.

1.6.7 PRESIÓN PARCIAL DEL HIDRÓGENO

La concentración del hidrógeno en la fase líquida, relacionada con la presión parcial del hidrógeno (p_{H_2}), es uno de los factores clave que afectan la producción de bio-hidrógeno (Hawkes et al., 2002; Mandal et al., 2006). La oxidación de la NADH, mediante la producción de bio-hidrógeno, sólo es termodinámicamente favorable cuando la p_{H_2} es menor a 60 Pa, de lo contrario se forman otros productos (Figura 1.6).

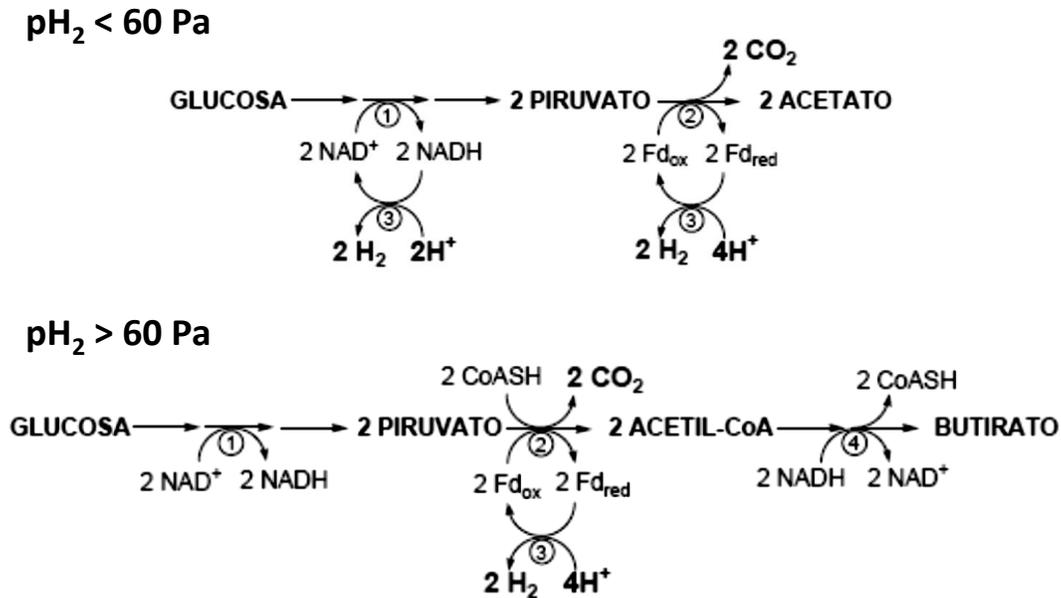


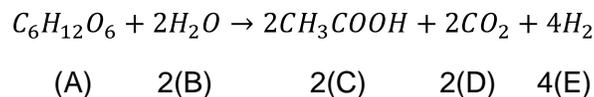
Figura 1.6. Efecto de la p_{H_2} en la producción de bio-hidrógeno. Reacciones: (1) metabolismo de la glucosa hacia piruvato; (2) descarboxilación del piruvato; (3) reducción de protones a hidrógeno; (4) fermentación butírica.

Fuente: Dávila-Vázquez y Razo-Flores, 2007.

Las rutas metabólicas para la producción de bio-hidrógeno son sensibles a las concentraciones de hidrógeno y están sujetas a la inhibición por producto. Conforme la concentración de hidrógeno se incrementa, su síntesis disminuye y la ruta metabólica cambia hacia la producción de compuestos más reducidos, e. g. lactato, etanol, acetona o butanol (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009).



Tomando en cuenta la estequiometría de la reacción de producción de bio-hidrógeno, mediante la formación de ácido acético, la constante de equilibrio (K_c) estaría dada por:



$$K_c = \frac{C^2 D^2 E^4}{A B^2}$$

Del principio de Le Chatelier se sabe que es posible dirigir la reacción hacia el lado derecho si al menos uno de los productos de la reacción (D o E) se remueve o disminuye. Si la pH_2 se reduce, la reacción se dirigirá hacia el lado derecho y la producción de bio-hidrógeno se incrementará debido a que la actividad de la enzima hidrogenasa aumentaría.

Una pH_2 alta afecta directamente a las reacciones metabólicas de la fermentación, por lo que se debe controlar mediante los parámetros que la alteran, tales como la agitación, la concentración del sustrato, la purga con gases inertes (teniendo en cuenta que no se baje mucho la concentración de hidrógeno en el biogás) y la extracción del biogás mediante membranas (Oh et al., 2002; Hawkes et al., 2002, 2007).

1.6.8 PRESIÓN PARCIAL DEL DIÓXIDO DE CARBONO

La cantidad de dióxido de carbono presente en el biorreactor afecta a la producción de hidrógeno, debido a que las células sintetizan el succinato y el formiato vía el dióxido de carbono, el piruvato y la NADH (Das y Veziroglu, 2001). La NADH es resultado de la conversión de la glucosa a piruvato y la re-oxidación de la NADH produce hidrógeno. Altas concentraciones de dióxido de carbono pueden favorecer la producción de fumarato o succinato, lo cual consume electrones, y por lo tanto disminuye la producción de bio-hidrógeno. Tanisho et al. (1998) mostraron que la remoción del dióxido de carbono duplicó la producción de bio-hidrógeno. Además, cuando removieron el dióxido de carbono del líquido, mediante burbujeo con gas argón e hidrógeno, encontraron que la presión parcial del dióxido de carbono tenía un efecto inhibitorio mayor que la presión parcial del hidrógeno.



1.7 SÍNTESIS DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS CON BIORREACTORES CON MEMBRANAS

La Tabla 1.3 resume los estudios relacionados con la producción de hidrógeno en biorreactores con membranas. Todos los estudios en los que se han empleado biorreactores con membranas se han realizado a escala laboratorio empleando lodo flocular y, hasta el momento, no se ha reportado el uso de biorreactores a base de gránulos para la producción de hidrógeno.

De los estudios reportados, el 75% ha empleado biorreactores CSTR con membranas sumergidas y el 25% ha usado biorreactores CSTR con membranas externas. Sin embargo, hace falta estudiar el proceso de producción de hidrógeno en otro tipo de biorreactores con membranas. Los biorreactores de flujo ascendente UASB se han llamado la atención de los investigadores debido a la capacidad que tienen para formar gránulos, los cuales representan una forma natural de inmovilización de la biomasa. Al acoplar las membranas al biorreactor UASB, se retendría toda la biomasa en el sistema, por lo que el riesgo de lavado de la biomasa, en caso de que se llegaran a disgregar los gránulos, sería mínimo.

En el 88% de los estudios realizados se han empleado azúcares simples (e. g. glucosa, sacarosa y fructuosa) como fuente de carbono. Lee et al. (2007) evaluaron la producción de bio-hidrógeno con tres sustratos diferentes y encontraron que la mayor producción de bio-hidrógeno se obtuvo para la fructuosa, seguida de la sacarosa y la glucosa. Respecto a la producción de bio-hidrógeno con efluentes reales sólo se tiene el estudio realizado por Kim et al. (2011).

El 13% de los estudios se han realizado en condiciones de temperatura ambiente (23 °C), el 63% en condiciones mesofílicas (35 °C) y el 13% en condiciones termofílicas (64 °C). Mientras que el estudio realizado por Oh et al. (2004) no se reportó la temperatura a la cual se realizó el estudio. En lo relativo al pH aplicado, el 88% de los experimentos se realizaron a un pH de 5.5 ± 0.5 , sólo en el estudio realizado por Lee et al. (2007) el pH varió entre 6.2 y 6.8.

Aunque se ha indicado que el TRH tiene un efecto importante en la producción de bio-hidrógeno, únicamente se cuenta con un estudio realizado por Oh et al. (2004) en el cual se discute el hecho de que los biorreactores con membrana presentan ventajas sobre los biorreactores CSTR cuando se aplican TRH cortos debido a que son capaces de retener la biomasa. Sin embargo, su objetivo no fue el de analizar el efecto que tiene el TRH en la producción de hidrógeno en los biorreactores con membranas.



Tabla 1.3. Estudios realizados con biorreactores con membranas para la producción de hidrógeno.

Sustrato	Tipo de reactor / Configuración de la membrana	Volumen del reactor (L)	TRH (h)	TRS (d)	DQO alimentada (g/L)	Flujo permeado ($L\ m^{-2}\ h^{-1}$)	Tasa de producción de hidrógeno ($L\ H_2\ L^{-1}\ h^{-1}$)	Rendimiento ($mol\ H_2 / mol\ sustrato$)	Ref.
Glucosa	CSTR / Externa	2	3.3 – 5.0	0.14 – 2.0	10	57 - 60	0.18 – 0.38	NR	Oh et al., 2004
Glucosa			4 -1		20		1.02 – 1.46	1.72 – 1.27	
Sacarosa	CSTR / Externa	5	2-1	NR	20	NR	1.67 – 2.07	1.51 – 1.39	Lee et al., 2007
Fructuosa			2 - 1		20		1.87 – 2.75	1.55 – 1.36	
Glucosa	CSTR / Sumergida	4.5	9	450	8.25	5	2.45 – 2.56	NR	Lee et al., 2008
Glucosa	CSTR / Sumergida	4.5	9	90	8.25 g-glucosa/L	5	0.10	0.86	Lee et al., 2009a
Glucosa	CSTR / Sumergida	4.5	9	12.5	16 g-glucosa/L	5	0.24 – 0.39	0.97 – 1.62	Lee et al., 2009b
Glucosa	CSTR / Sumergida	7	8	1	1.3-10 g-glucosa/L	11.1	0.83 – 8.33 $mmol\ H_2\ L^{-1}\ h^{-1}$	0.97 – 1.77	Shen et al., 2009, 2010
Glucosa	CSTR / Sumergida	7	9	2-12.5 / 90	16	NR	3.9-5.8 / 2.0	1.19 – 1.03 / 0.34	Lee et al., 2010
Residuos de tofu	CSTR / Sumergida	7	2-8	NR	26.5 g-DQO _{soluble} /L	4.32 - 8.64	0.53 – 0.83	0.96 – 1.87 $mol\ H_2/mol\ hexosa$	Kim et al., 2011

Notas:

NR No Reportado



A pesar de que la TCO tiene un efecto importante sobre la producción de bio-hidrógeno, sólo existe un artículo en el cual se discute su efecto en los biorreactores con membranas. Shen et al. (2009) compararon el desempeño de un biorreactor CSTR con el de un biorreactor con membranas sumergidas y determinaron que bajo condiciones cercanas a la sobrecarga, el biorreactor con membranas resultó más eficiente que el biorreactor CSTR respecto a la producción de hidrógeno.

Existe poca información sobre los mecanismos de colmatación de la membrana durante la producción de hidrógeno. No obstante, en aquellos estudios en los que se analizó la colmatación se observó que la formación de la biotorta fue el principal mecanismo de colmatación de la membrana (Oh et al., 2004; Lee et al., 2008; Shen et al., 2010).

1.8 JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

En la actualidad el tratamiento de las aguas residuales se ve como un costo que se tiene que asumir sin que se tenga algún beneficio de dicha actividad. Debido a esto, el tratamiento que reciben las aguas residuales en ocasiones no es el adecuado. Sin embargo, si se pudiera cambiar esta apreciación, es decir, si en vez de que se viera al tratamiento de las aguas residuales como una fuente de egresos se le viera como una fuente de ingresos, el tratamiento del agua residual podría resultar financieramente atractivo.

Como ya se ha expuesto, durante el tratamiento anaerobio de las aguas residuales se pueden obtener subproductos valiosos como el hidrógeno, cuyo contenido energético es 2.75 veces mayor al de los combustibles de origen fósil, y cuya combustión no genera gases de efecto invernadero. Así pues, resulta interesante la posibilidad de obtener energía mediante el tratamiento de las aguas residuales.

Si bien el empleo de los distintos tratamientos para controlar la actividad de los microorganismos consumidores de hidrógeno ha mostrado resultados adecuados, su implementación a gran escala es poco factible. Esto origina la necesidad de establecer nuevas metodologías que permitan la obtención del inóculo productor de hidrógeno sin la necesidad de recurrir a metodologías costosas y/o poco prácticas.

Aunque algunos de los parámetros operacionales empleados para la producción de bio-hidrógeno ya se tienen bien estudiados (por ejemplo, la temperatura y el pH), aún falta



esclarecer el efecto de algunos otros parámetros. Este es el caso del TRH y de la TCO, de los cuales se tiene escasa información sobre su efecto en la producción de hidrógeno empleando biorreactores con membranas.

Para la producción de bio-hidrógeno a escala industrial, tanto el rendimiento como la velocidad de producción son parámetros importantes para la evaluación del proceso (Guo et al., 2008b). La tasa de producción de hidrógeno (TPH) es un factor clave para evaluar el desempeño de un proceso fermentativo de producción de hidrógeno, mientras que el rendimiento de la producción de hidrógeno (Y_{H_2}) se usa para evaluar la productividad entre diferentes sustratos (Shen et al., 2009).

Hasta ahora, la mayoría de los estudios se han centrado en incrementar el Y_{H_2} . El mayor rendimiento teórico (4 mol H_2 /mol glucosa) está relacionado con la producción de ácido acético. Sin embargo, cuando se trabaja con cultivos mixtos el Y_{H_2} está en función de una fermentación ácido mixta (Nath y Das, 2004). Además, uno de los retos de la producción de bio-hidrógeno es el de obtener un flujo suficiente para determinar su factibilidad para la generación sostenible de energía a gran escala (Levin et al., 2004).

El presente trabajo se enfoca a dos aspectos importantes para la producción de bio-hidrógeno. El primer aspecto está relacionado con la adaptación del inóculo productor de hidrógeno de una manera más práctica, es decir, mediante la presión de selección ejercida mediante los parámetros operacionales, tales como el pH, el TRH y el régimen de flujo (continuo o discontinuo), con la intención de evitar el uso de tratamientos que pueden resultar costosos.

El siguiente aspecto está enfocado a investigar el efecto que tiene la TCO y el TRH en la producción de hidrógeno en un biorreactor con membranas. En este punto, se incursiona en el empleo de un biorreactor con membranas inoculado con lodo anaerobio granular. Con esto, se pretende generar información sobre un sistema que, aunque ya se ha empleado con otros fines, no se evaluado para la producción de bio-hidrógeno.

Así, la presente investigación trata de proporcionar las condiciones de operación óptimas para la producción de hidrógeno en un biorreactor con membranas, esperando que dichos resultados sirvan de guía para el escalamiento del proceso.





CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





2.1 HIPÓTESIS

Es posible suprimir la actividad metanogénica del inóculo para favorecer la producción de bio-hidrógeno mediante la aplicación de una presión de selección ejercida a través de los parámetros operacionales (pH y tiempo de residencia hidráulica).

La retención de la biomasa en el sistema, debido a la acción de las membranas, permitirá obtener una tasa de carga orgánica a la cual la producción de bio-hidrógeno se verá favorecida. Asimismo, se podrá definir el tiempo de residencia hidráulica, asociado a dicha carga orgánica, en la cual el sistema presentará la mayor producción de bio-hidrógeno.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Llevar a cabo la evaluación de la influencia de los parámetros operacionales de un biorreactor con membranas sobre la producción de hidrógeno partiendo de la transformación de la glucosa como única fuente de carbono.

2.3 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto del pH inicial y la cantidad de alcalinidad adicional que debe suministrarse al biorreactor, junto con la solución de alimentación, para la producción de bio-hidrógeno utilizando lodo anaerobio granular sin tratamiento previo.
2. Evaluar la capacidad específica de producción de hidrógeno de los microorganismos que sedimentan (biomasa sedimentable) y de los microorganismos que no sedimentan (biomasa no sedimentable) mediante pruebas bioquímicas de producción de hidrógeno.
3. Evaluar una metodología para la adaptación de los gránulos anaerobios que permita la supresión de su actividad metanogénica y favorezca la producción de hidrógeno.
4. Evaluar la influencia de la tasa de carga orgánica en un biorreactor con membranas sumergidas inoculado con lodo anaerobio granular.
5. Evaluar la influencia del tiempo de residencia hidráulica en un biorreactor con membranas sumergidas inoculado con lodo anaerobio granular.



6. Determinar la factibilidad teórica de la producción de bio-hidrógeno con un contenido de hidrógeno entre el 5% y 20%, mediante un balance de masas de un proceso de digestión en dos etapas.



CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS





3.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL

El presente estudio estuvo enfocado a dos aspectos principales, determinar las mejores condiciones de obtención del inóculo e incrementar la producción de bio-hidrógeno mediante los parámetros operacionales (TCO y TRH) en un biorreactor con membranas sumergidas.

La estrategia experimental se dividió en cinco etapas (Figura 3.1). Primero se evaluó el efecto del pH inicial y la alcalinidad en la producción de bio-hidrógeno. En ambos casos se empleó un biorreactor UASB inoculado con lodo anaerobio granular sin tratamiento ni aclimatación previa. El biorreactor se operó de manera discontinua secuencial. Se evaluaron tres niveles de pH inicial el cual se ajustó al inicio de cada ciclo y se dejó evolucionar libremente con el proceso. Posteriormente se evaluó el efecto de la alcalinidad para lo cual se aplicaron tres niveles de alcalinidad agregada. Cada nivel de alcalinidad se ajustó agregando bicarbonato de calcio al inicio de cada ciclo.

En la segunda etapa se evaluó la capacidad específica de producción de hidrógeno del lodo flocular y del lodo anaerobio granular. Para determinar la capacidad de producción del lodo flocular se empleó un biorreactor discontinuo secuencial. El lodo flocular recibió un tratamiento térmico para inhibir la actividad de las bacterias consumidoras de hidrógeno. Después del tratamiento, la biomasa se depositó en el biorreactor y se llevó a cabo la aclimatación de la misma. Posteriormente se incrementó el tiempo de sedimentación para obtener dos tipos de biomasa. La biomasa que logró sedimentar se denominó biomasa sedimentable y aquella que no sedimentó se denominó biomasa no sedimentable. Una vez separadas dichas biomasas se realizaron pruebas bioquímicas de producción de hidrógeno y se ajustaron los datos al modelo de Gompertz modificado.

Para evaluar la capacidad de producción del lodo anaerobio granular se realizaron pruebas bioquímicas de producción de hidrógeno. En este caso, el lodo no recibió ningún tratamiento previo ni se aclimató para la producción de hidrógeno. Los datos obtenidos se ajustaron al modelo de Gompertz modificado para determinar los parámetros cinéticos de la producción de bio-hidrógeno, así como la producción potencial máxima específica de las biomasas ensayadas. A partir de los resultados obtenidos se seleccionó a la biomasa que presentó la mayor producción de bio-hidrógeno como fuente de inóculo para los experimentos siguientes.

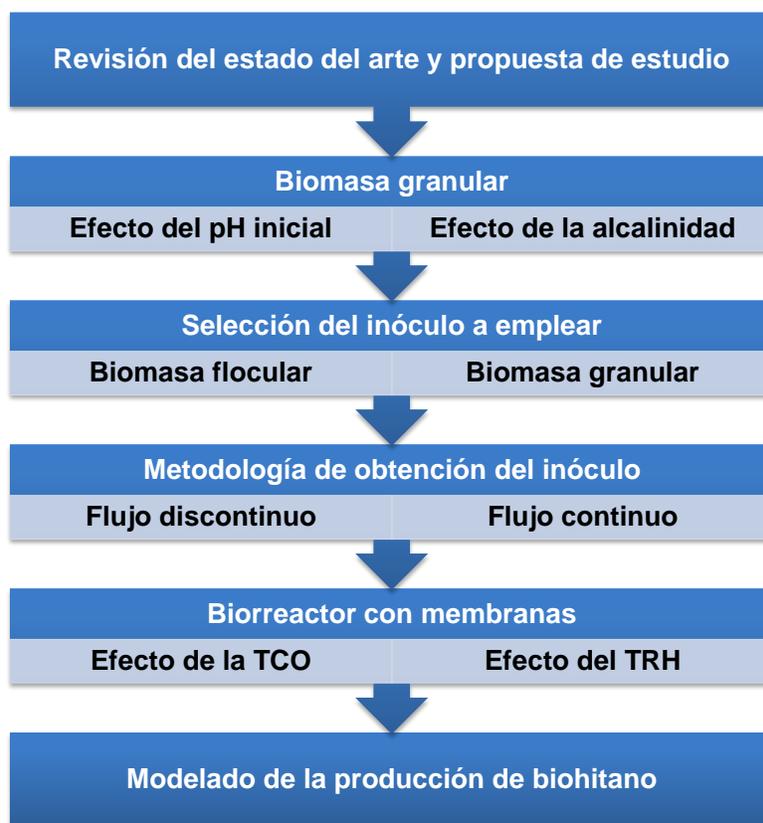


Figura 3.1. Diagrama de la estrategia experimental seguida.

En seguida se evaluaron dos estrategias de obtención del inóculo productor de hidrógeno. En la primera estrategia se utilizó un biorreactor UASB inoculado con lodo anaerobio granular sin tratamiento previo. El biorreactor se operó de manera discontinua y se fue reduciendo gradualmente el TRH. A partir de los resultados obtenidos en la estrategia de adaptación en discontinuo, en la segunda estrategia se utilizó un biorreactor UASB inoculado con lodo anaerobio granular sin tratamiento ni aclimatación previa. El biorreactor se operó de manera continua pero a condiciones de TRH y pH menores que los empleados en la estrategia en discontinuo. A partir de los resultados obtenidos, se seleccionó la metodología que fue capaz de suprimir la actividad metanogénica del inóculo de manera más rápida.

Posteriormente se evaluó, de manera individual, el efecto de la TCO y del TRH en la producción de hidrógeno en el biorreactor con membranas. En ambos casos se empleó el biorreactor UASB que se había utilizado en la estrategia de obtención del inóculo en continuo. Para evaluar el efecto de la TCO ésta se fue incrementando gradualmente hasta que se observó la sobrecarga del biorreactor. En el caso del efecto del TRH éste se redujo hasta que



se observó una disminución en la producción de hidrógeno debido a un cambio en la ruta metabólica. Con los resultados obtenidos fue posible determinar las condiciones óptimas de operación del biorreactor con membranas.

Finalmente, derivado de una estancia de investigación realizada en el Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), en Francia, se realizó el modelado de la producción bio-hidrógeno en un proceso de tratamiento anaerobio en dos etapas mediante un balance de masas.

3.2 PREPARACIÓN DEL AGUA RESIDUAL SINTÉTICA

Para preparar el agua residual sintética se agregaron los siguientes nutrientes por cada litro de agua corriente empleada: K_2HPO_4 , 250 mg; NH_4Cl , 2600 mg; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 2.5 mg; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 125 mg; KI, 2.5 mg; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 mg; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 2.5 mg; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.5 mg; H_3BO_3 , 0.5 mg; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.5 mg; $ZnCl_2$, 0.5 mg. Todos los reactivos se adquirieron con J. T. Baker (USA). Se utilizó glucosa como única fuente de carbono. El pH final del medio fue de 7.0 ± 0.1 .

3.3 INÓCULO

3.3.1 LODO ANAEROBIO FLOCULAR

Se obtuvo lodo anaerobio granular de un biorreactor UASB, a escala real, que trata las aguas residuales de una industria cervecera. El lodo se sometió a un tratamiento térmico el cual consistió en calentar el lodo a 104 ± 2 °C durante 24 h con el objeto de inhibir la actividad de los microorganismos consumidores de hidrógeno. Después del tratamiento térmico, se trituró el lodo en un mortero y se cribó mediante el empleo de un tamiz del número 20 para obtener un tamaño promedio de partícula de 850 μm .

3.3.2 LODO ANAEROBIO GRANULAR

Se obtuvo lodo anaerobio granular proveniente de un biorreactor UASB, a escala real, que trata las aguas residuales de una industria cervecera. El inóculo no recibió ningún tratamiento ni se aclimató previamente para la producción de bio-hidrógeno.



3.4 DISPOSITIVOS EXPERIMENTALES

3.4.1 BIORREACTOR DISCONTINUO SECUENCIAL

La configuración del biorreactor discontinuo secuencial empleado para la aclimatación de la biomasa flocular en la segunda etapa experimental se muestra en la Figura 3.2. El volumen nominal del biorreactor fue de 6 L con un volumen de trabajo de 4 L. El biorreactor se construyó con vidrio y se equipó con una manta térmica de 200 W de resistencia, 2 bombas peristálticas para la dosificación de ácido clorhídrico (1N HCl) e hidróxido de sodio (2N NaOH) en función de los requerimientos del sistema., la agitación se llevó a cabo mediante un agitador mecánico. Adicionalmente se instaló una bomba peristáltica para la alimentación del biorreactor y otra bomba para el vaciado del mismo.



Figura 3.2. Biorreactor empleado para la aclimatación de la biomasa flocular.

La temperatura (35 ± 1 °C), el pH (5.5 ± 0.1), la agitación (200 rpm), el llenado y el vaciado del biorreactor se controlaron automáticamente (ADI 1030 Bio Controller, Applikon). La concentración de sólidos suspendidos volátiles se mantuvo a 6.0 ± 0.2 g-SSV/L, para lo cual se midió semanalmente la concentración de sólidos en el biorreactor y se purgó la cantidad necesaria de lodo para mantener la concentración de sólidos requerida. El biogás producido se midió con un dispositivo Mariotte.



El biorreactor se operó de la siguiente forma: tiempo de llenado 3 min, tiempo de reacción 665 min, tiempo de sedimentación 30 min, tiempo de vaciado 8 min, tiempo muerto 11 min. El volumen de intercambio en cada ciclo fue de 2 L. La longitud del ciclo fue de 12 h, la relación tiempo de reacción / tiempo de sedimentación fue de 22 y el TRH fue de 24 h.

Se consideró que la biomasa estaba aclimatada para la producción de hidrógeno cuando la composición del biogás y su tasa de producción presentaron una variación máxima de $\pm 10\%$.

3.4.2 BIORREACTORES UASB

Todos los biorreactores UASB empleados se fabricaron con acrílico debido a que su permeabilidad al hidrógeno ($1.24 \times 10^9 \text{ mol-H}_2/\text{m}\cdot\text{s}\cdot\text{MPa}$) es baja en comparación con otros materiales (San Marchi y Somerday, 2008), además de que permite observar el comportamiento de la biomasa en el interior del biorreactor. Al inicio de cada experimento el biorreactor se purgó con gas nitrógeno para asegurar condiciones anaerobias.

3.4.2.1 BIORREACTOR EMPLEADO PARA EVALUAR EL EFECTO DEL pH INICIAL

El biorreactor UASB empleado tuvo un volumen útil de 630 mL (Figura 3.3). Se inoculó con $5.0 \pm 0.3 \text{ g-SSV/L}$ de lodo anaerobio granular. Los gránulos presentaron diámetros entre 0.5 y 1.7 mm. El mezclado se realizó mediante la recirculación del sobrenadante a una velocidad de flujo ascendente de $2.0 \pm 0.1 \text{ m/h}$.



Figura 3.3. Biorreactor UASB empleado para la evaluación del efecto del pH inicial.



La temperatura ($35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) se controló mediante un serpentín de cobre cubierto con fibra de vidrio como aislante. Se evaluaron tres niveles de pH inicial (5.5, 7.0 y 7.3). El pH se ajustó tanto en el influente como dentro del biorreactor añadiendo 1N HCl o 2N NaOH en función del pH requerido. Al final de cada lote se ajustó el pH del sistema al nivel deseado.

El biorreactor se cubrió con aluminio para evitar el crecimiento de microorganismos fotosintéticos. La operación del biorreactor fue de la siguiente manera: alimentación (9 min), reacción (1390 min), sedimentación (5 min), vaciado (12 min), tiempo muerto (24 min). El volumen de intercambio en cada ciclo fue de 0.5 L. La longitud del ciclo fue de 24 h y el TRH fue de 30 h. La producción de biogás se cuantificó mediante el principio del desplazamiento de columna de agua.

3.4.2.2 BIORREACTOR EMPLEADO PARA EVALUAR EL EFECTO DE LA ALCALINIDAD

El biorreactor UASB utilizado tiene un volumen útil de 1.3 L con un volumen de trabajo de 1.0 L (Figura 3.4). El biorreactor se inoculó con lodo anaerobio granular a una concentración de $7.3 \pm 0.4 \text{ g-SSV/L}$. El mezclado se realizó mediante la recirculación del sobrenadante a una velocidad de flujo ascendente de $2.0 \pm 0.1 \text{ m/h}$. La carga orgánica fue de $5 \text{ g-glucosa L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.



Figura 3.4. Biorreactor UASB utilizado para la evaluación del efecto de la alcalinidad.

La temperatura dentro del biorreactor ($35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) se mantuvo empleando un sistema compuesto por un termociclador acoplado a un serpentín cubierto con fibra de vidrio y aluminio.



El pH (5.5 ± 0.1) se monitoreo y se controló continuamente (Hanna BL 981411, Hanna Instruments®) y se ajustó agregando 2N NaOH en función de los requerimientos del sistema. La producción de biogás se midió a través de un medidor de gas (Prendo, Sistemas y Equipos de Vidrio) que funciona bajo el principio del desplazamiento de columna de agua.

El biorreactor se operó con los tiempos siguientes: alimentación: 2 min; reacción: 1285 min; sedimentación: 2 min; vaciado: 3 min; tiempo muerto: 2 min. El volumen de intercambio en cada ciclo fue de 0.9 L. La longitud del ciclo fue de 21.6 h y el TRH fue de 24 h.

3.4.2.3 BIORREACTORES EMPLEADOS EN EL DESARROLLO DE LA ESTRATEGIA DE OBTENCIÓN DEL INÓCULO

Para el desarrollo de la metodología de adaptación del inóculo productor de bio-hidrógeno con un régimen de flujo discontinuo se utilizó el biorreactor UASB que se describió en la sección 3.4.2.2 (Figura 3.4). La carga orgánica se mantuvo a $5 \text{ g-glucosa L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Se probaron tres niveles de TRH. La operación de las bombas de llenado y vaciado del biorreactor se realizó mediante un sistema de control (ChronTrol, ChronTrol Corporation) para mantener el TRH requerido.

El biorreactor se operó de la siguiente manera: tiempo de llenado 2 min, tiempo de reacción variable en función del TRH requerido, tiempo de sedimentación 2 min, tiempo de vaciado 3 min, tiempo muerto 2 min. El volumen de intercambio en cada ciclo fue de 0.9 L. Esto resultó en TRH de 24 h, 12 h y 6 h. La longitud de los ciclos fue de 21.6 h, 10.8 h, y 5.4 h, respectivamente. La temperatura dentro del biorreactor ($35 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$) se controló mediante una resistencia eléctrica acoplada a un controlador de temperatura (Temperature controller, Thermo Scientific).

Para el desarrollo de la metodología de adaptación del inóculo productor de bio-hidrógeno con un régimen de flujo continuo se utilizó un biorreactor UASB con un volumen nominal de 3.0 L y un volumen de trabajo de 1.9 L (Figura 3.5).

El biorreactor se inoculó con $7.3 \pm 0.4 \text{ g-SSV/L}$ de lodo anaerobio granular y se operó de manera continua. La carga orgánica se mantuvo a $5 \text{ g-glucosa L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. El TRH se mantuvo controlado a 5.5 h. El pH se monitoreo continuamente y se ajustó a 4.5 ± 0.1 (Hanna BL



981411, Hanna Instruments®) agregando 2N NaOH en función de los requerimientos del sistema.



Figura 3.5. Biorreactor UASB utilizado para el desarrollo de la estrategia de obtención del inóculo bajo una régimen de flujo continuo.

La temperatura dentro del biorreactor ($35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) se controló mediante una resistencia eléctrica acoplada a un controlador de temperatura (Input Controller, Thermo Scientific). El mezclado se realizó mediante la recirculación del sobrenadante a una velocidad de flujo ascendente de $2.0 \pm 0.1\text{ m/h}$. La producción de biogás se cuantificó con un medidor de gas (Prendo, México) que funciona bajo el principio de desplazamiento de columna de agua.

3.4.2.4 BIORREACTOR EMPLEADO PARA EVALUAR EL EFECTO DE LA TCO Y DEL TRH

Se empleó el biorreactor UASB con el cual se desarrolló la estrategia de obtención del inóculo bajo condiciones de flujo continuo (Figura 3.5).

Se utilizó un módulo de membranas de fibras huecas fabricadas con difluoruro de polivinilideno (MEMOS GmbH), el cual se sumergió dentro del biorreactor (Figura 3.6). El módulo de membranas tiene un área de 0.04 m^2 , un tamaño de corte molecular de 250 kDa y un diámetro de poro de $0.1\text{ }\mu\text{m}$. El permeado se extrajo mediante ciclos combinados de 9.83 min de succión (Easy-Load II, Masterflex) y 0.17 min de retrolavado (Gamma/L, ProMinent®) empleando el mismo permeado.

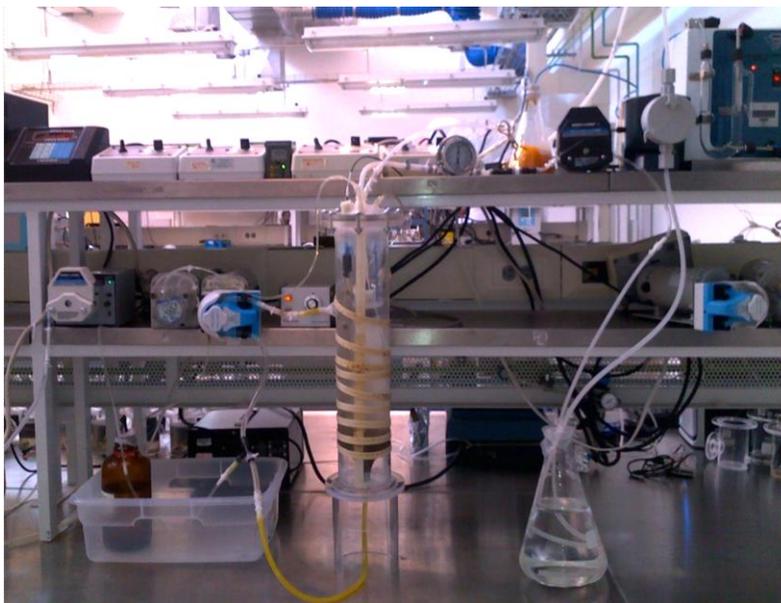


Figura 3.6. Biorreactor UASB empleado para evaluar el efecto de la TCO y del TRH.

El flujo permeado se reguló mediante la operación manual de la presión de succión. La presión transmembrana (PTM) se monitoreo con un manovacuometro análogo (DeWit). Cuando la PTM sobrepasaba el valor de los 55 kPa (máxima PTM aplicable de acuerdo a las recomendaciones del fabricante: 60 kPa), las membranas se limpiaban mediante un enjuague con agua limpia. Cuando el flujo permeado disminuía 20% de su valor inicial, la membrana se lavaba químicamente de acuerdo a lo indicado por Lim y Bai (2003). Esta operación consistió en sumergir el módulo de membranas en una solución alcalina durante 12 h y se enjuagaba con agua desionizada (retrolavado por 15 min) para remover el álcali y cualquier material que no se hubiese desprendido de la membrana. Posteriormente el módulo de membranas se sumergía en una solución ácida durante 12 h y se enjuagaba con agua desionizada. El álcali empleado fue una mezcla de 1M NaOH (pH 12) y una solución de hipoclorito de sodio al 0.05%. Para el tratamiento ácido se empleó una solución 1M HNO₃ (pH 2). Al final de cada prueba la membrana se lavaba químicamente, tal como se describió anteriormente, para restaurar sus condiciones de filtración iniciales.

Para evaluar el efecto de la TCO, ésta se incrementó gradualmente de 5 a 60 kg-glucosa m⁻³ d⁻¹ manteniendo el TRH a 5.5 h. Para evaluar el efecto del TRH, éste se redujo gradualmente de 5.5 a 1.25 h manteniendo la TCO a 30 kg-glucosa m⁻³ d⁻¹. Para evaluar la distribución de las resistencias de la membrana se empleó el modelo de resistencias en serie.



3.4.3 BIORREACTOR TEÓRICO EMPLEADO PARA LA MODELACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIO-HITANO

Para llevar a cabo la modelación de la producción de bio-hitano se partió de un reactor teórico (Figura 3.7) el cual está compuesto por un dos biorreactores a escala piloto interconectados con un conjunto de válvulas controladas para que trabajen de manera simultánea.

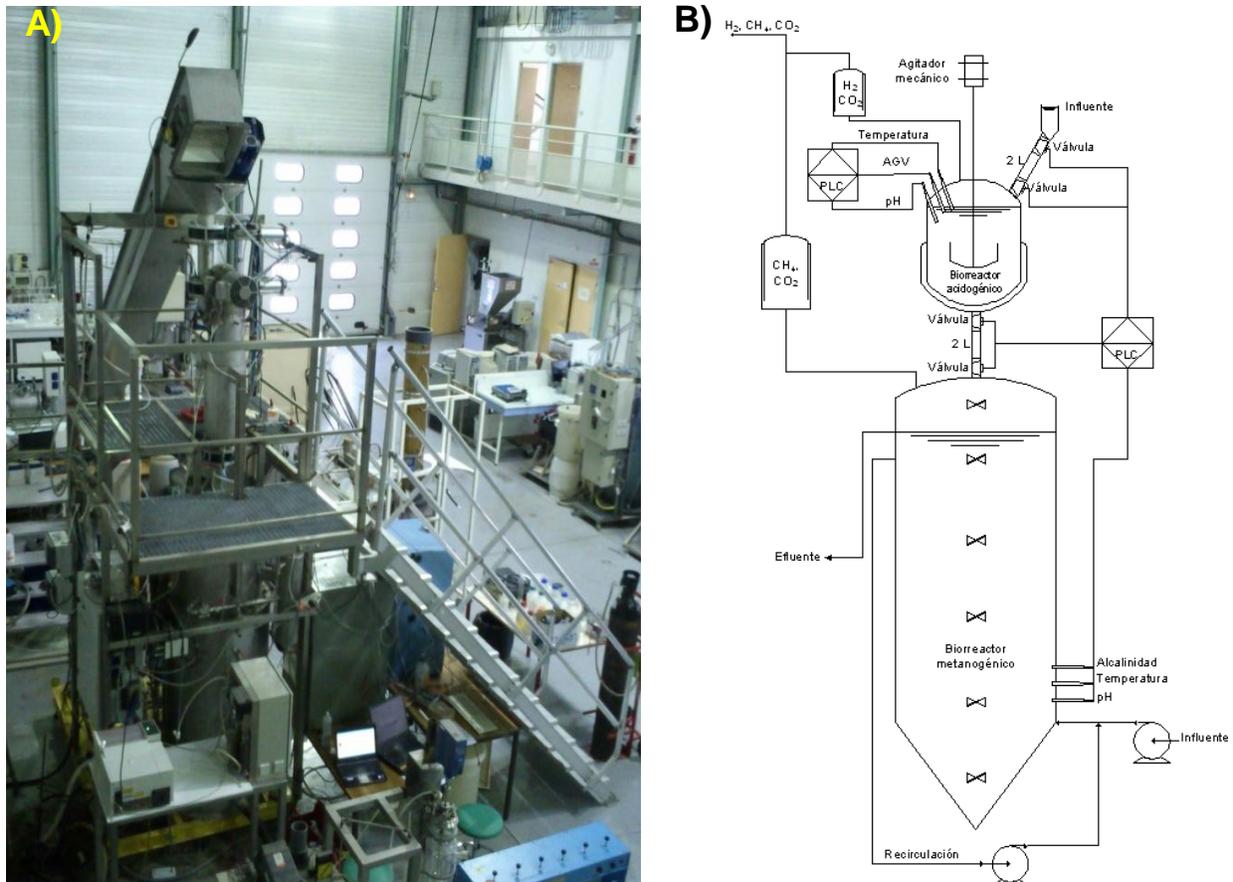


Figura 3.7. Sistema de digestión en dos etapas empleado para la modelación de la producción de bio-hitano. A) Biorreactor y B) Esquema.

En el biorreactor acidogénico (R_1 : biorreactor CSTR de 22 L) se lleva a cabo la producción de bio-hidrógeno. Este biorreactor se alimentó con glucosa por una entrada lateral en la que un sistema de válvulas permite alimentar al biorreactor y al mismo tiempo evita la salida continua del biogás producido. La producción de metano se llevó a cabo en un segundo biorreactor (R_2 : biorreactor CSTR de 358 L). Este biorreactor se alimentó con vinazas de vino por una entrada lateral. Durante la etapa de alimentación del biorreactor acidogénico (2 L de sustrato) se



transfieren 2 L de licor mezclado hacia el biorreactor metanogénico. Esto da lugar a la transferencia de un volumen de biogás producido en el biorreactor metanogénico hacia el biorreactor acidogénico.

Ambos biorreactores se trabajan en condiciones mesofílicas (35 °C) a un pH de 5.5 para el biorreactor acidogénico y de 7 para el biorreactor metanogénico. El modelo consideró un flujo constante de vinazas y estado estacionario en el proceso. Las ecuaciones resultantes se resolvieron mediante la herramienta “Solver” de Microsoft Excel.

3.4.4 SISTEMA AUTOMATIZADO DE BIODEGRADABILIDAD ANAEROBIA

Para realizar las pruebas bioquímicas de producción de hidrógeno se empleó el Sistema Automatizado de Biodegradabilidad Anaerobia (Figura 3.8), el cual se desarrolló para la medición de la producción de biogás (H_2 o CH_4 y CO_2) tal como lo describe Vargas et al. (2009).



Figura 3. 8. Equipo empleado en las pruebas bioquímicas de producción de hidrógeno.

La producción de biogás se mide mediante transductores de presión y un juego de válvulas solenoides. El prototipo desarrollado cuantifica el aumento de la presión debido a la producción de biogás durante la degradación anaerobia de la materia orgánica. La presión se mide en intervalos regulares que dependen de la tasa de producción de biogás. Durante cada medida de presión, la botella puede alcanzar la presión atmosférica mediante la operación de una válvula



solenoides, evitando trabajar con sistemas bajo presión, ya que se pueden presentar fugas de biogás o inhibición de los microorganismos.

Los biorreactores empleados fueron botellas Shott (Shott Duran™) con un volumen nominal de 300 mL y un volumen de trabajo de 150 mL. El mezclado se realizó mediante agitadores magnéticos. La temperatura de la cámara de pruebas se mantuvo a 35 ± 1 °C. Antes de cada prueba las botellas se purgaron con nitrógeno para asegurar condiciones anaerobias. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

3.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.5.1 SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES Y VOLÁTILES

La cuantificación de los sólidos se realizó por gravimetría mediante el procedimiento descrito en los métodos estándar (APHA, 2005).

3.5.2 DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO

Para la determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) se utilizaron tubos Hach con una solución estándar (dicromato de potasio, ácido sulfúrico, plata, mercurio) para determinar la DQO en un rango de 0 – 1 500 mg-DQO/L. La determinación del valor de la DQO se realizó en un espectrofotómetro portátil (Hach DR/2010) de acuerdo a lo indicado en los métodos estándar (APHA, 2005).

3.5.3 CARACTERIZACIÓN DEL BIOGÁS

La composición del biogás producido (hidrógeno, metano y dióxido de carbono) se realizó mediante un cromatógrafo de gases (SRI 8610C) equipado con un detector de conductividad térmica y dos columnas empacadas en acero inoxidable (6' x 1/8" sílice gel y 6' x 1/8" corte molecular 13X). La temperatura del inyector y del detector fue de 90 °C y 150 °C, respectivamente. La temperatura inicial de la columna fue de 40 °C la cual se mantuvo durante 4 minutos y se incrementó hasta 110 °C a una velocidad de 20 °C/min. La temperatura final de la columna se mantuvo durante 3 minutos. Se usó nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 20 mL/min.

3.5.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES, ETANOL Y ACETONA

La determinación de la concentración de los ácidos grasos volátiles (ácidos acético, propiónico, butírico y valérico), el etanol y la acetona se realizó mediante un cromatógrafo de gases (Varian



3300) equipado con un detector de ionización por flama y una columna capilar (longitud 15 m, diámetro interno 0.53 mm, Zebron ZB-FFAP, Phenomenex). La temperatura del inyector y del detector se mantuvo a 190 °C y 210 °C, respectivamente. La temperatura de la columna se mantuvo a 45 °C durante 1.5 min y se incrementó hasta los 135 °C a una tasa de 8 °C/min. Se usó nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 9.5 mL/min. Las muestras se centrifugaron a 600 g y se acidificaron a un pH de 2 con ácido fosfórico (J. T. Baker, USA). La muestra se almacenó a 4 °C hasta su análisis.

La fracción no disociada de los ácidos acético y butírico se calculó con base en un pK_a de 4.76 para el ácido acético y de 4.82 para el ácido butírico, mediante la ecuación siguiente (Akutsu et al., 2009)

$$\frac{HA}{HA + A^-} = \frac{10^{(pK_a - pH)}}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} \quad (3.1)$$

Donde HA es la concentración no disociada del ácido, A^- es la concentración disociada del ácido, $HA+A^-$ es la concentración medida del ácido, y pK_a es la constante de disociación del ácido.

3.5.5 CUANTIFICACIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS

La cantidad de polisacáridos presentes en el medio se determinó siguiendo el método del fenol – ácido sulfúrico descrito por Dubios et al. (1956) utilizando glucosa como referencia.

3.5.6 CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

La cantidad de proteínas producidas por el inóculo se determinó mediante el método de los reactivos Folín-fenol descrito por Lowry et al. (1951) utilizando albúmina bovina como estándar.

3.5.7 TINCIÓN DE LOS GRÁNULOS CON MARCADORES MOLECULARES FLUORESCENTES

Durante el desarrollo de las metodologías de adaptación del inóculo productor de hidrógeno se obtuvieron muestras de los gránulos en diferentes etapas. La morfología de los gránulos se analizó mediante un estéreo microscopio.

La distribución de las células y β -polisacáridos en los gránulos se analizó mediante un microscopio de epifluorescencia (Axio Imager Z1, Carl Zeiss) equipado con una cámara



(AxioCam MR3, Carl Zeiss). Los gránulos se cortaron en secciones de 60 μm mediante un criomicrotomo rotatorio (CM 1900, Leica). Estas secciones se tiñeron con dos marcadores moleculares fluorescentes. Se utilizó el marcador molecular Calcofluor white (Sigma) para teñir a los β -1,4 y β -1,3 polisacáridos (De Beer et al., 1996). El marcador molecular SYTOX Green (Molecular Probes) se usó para teñir a las células (González-Fernández, 2012).

Los gránulos se fijaron en una solución de etanol al 50% (v/v) y después se tiñeron con 30 mg/L de Calcofluor white preparado en una solución búfer salina de fosfato (PBS) 1X a un pH de 7.2 durante 30 min. El exceso del marcador se removió lavando dos veces con la solución búfer. Posteriormente, la muestra se tiñó durante 5 min con 250 mg/L de una solución de SYTOX Green preparada con el búfer PBS a un pH de 7.2 y después se lavó con la solución PBS. Los gránulos se visualizaron con un objetivo de 10X y se analizaron con el software AxioVision LE (Carl Zeiss).

3.6 BIOLOGÍA MOLECULAR

Durante la operación del reactor se tomaron muestras de manera periódica de la biomasa, las cuales permanecieron en congelación (-20°C) previo a su análisis. El ADN total se extrajo y se purificó a partir de muestras de 2 mL del lodo usando un kit de aislamiento de ADN (UltraClean Soil DNA isolation kit, MoBio) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La extracción del ADN se verificó mediante gel de agarosa al 1%.

El ADN extraído se usó para la amplificación del gen 16S rRNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). La mezcla de la reacción (volumen total: 30 μL) contenía 12.5 μL de TopTaq PCR Master Mix Qiagen (0.25 unidades de DNA Polimerasa, 200 μM de cada dNTPs, búfer para PCR 1.5 mM MgCl_2), 5 μL de ADN, 10 mM cada cebador o primer (por su nombre en inglés), 4 μL MgCl_2 (50 mM) y 6.5 μL agua libre de RNAsas.

Se emplearon dos cebadores universales de bacteria, específicos para el gen 16S rRNA, los cuales fueron 534R (ATT ACC GCG GCT GCT GG) y 46F-GC (CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAA CAC ATG CAA GTC). La amplificación por PCR se realizó con el siguiente programa: 2 min a 94°C para la desnaturalización inicial, seguida de 30 ciclos de desnaturalización (94°C durante 1 min, 54°C para alineación durante 1



minutos y elongación a 72 °C durante 1 min), y una extensión final a 72 °C durante 7 min, utilizando un termociclador Gradient Palm-Cycler (Corbett Research, Australia). Los productos de la amplificación por PCR se confirmaron mediante electroforesis con un gel de agarosa al 1% (w/w).

Los productos de la PCR se separaron por la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE por sus siglas en inglés) usando el sistema D-code Universal Mutation Detection System (BioRad, Hercules, CA) según lo descrito por Muyzer et al. (1995). Se utilizó una solución de acrilamida al 8% (w/v) para formar un gel con gradientes desnaturizantes que van del 40% al 60% para el fragmento universal de ADN de bacterias. La electroforesis se llevó a cabo en una solución búfer 0.5x TAE (40 mM Tris, 40 mM ácido acético y 10 mM de EDTA 2Na • 2H₂O) a 80 V y 60 ° C durante 17 h.

Los geles se tiñeron durante 40 min con SYBR green (Invitrogen), se destiñeron con agua desionizada durante 10 minutos. Los geles se visualizaron con radiación UV y se fotografiaron (Gel Logic 200 Imaging System, Eastman Kodak Company). Las bandas seleccionadas del DGGE para su secuenciación se cortaron manualmente y se colocaron en 80 µL de agua libre de RNAsas (Sigma-Aldrich). El ADN se eluyó a través de un proceso de congelación y descongelación: las muestras se almacenaron a -20 ° C durante 16 h, posteriormente se descongelaron a temperatura ambiente durante 3 h y finalmente se dejaron descongelar a 4 ° C durante la noche. Se utilizó 1 µL de cada parte alícuota como base para la PCR. Los fragmentos de ADN eluido se re-amplificaron con el conjunto de cebadores 46F (GCCTAACACATGCAAGTC) / 534R. Los productos se confirmaron por electroforesis con un gel de agarosa al 1% (w/v).

Los amplicones seleccionados se enviaron a secuenciar en un servicio de secuenciación externa (Macrogen, Korea). La identificación de las secuencias obtenidas se realizó por medio de una búsqueda en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) mediante el software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, National Center for Biotechnology Information) (Altschul et al., 1990).



3.7 ANÁLISIS CINÉTICO

El modelo de Gompertz modificado se ajustó a los datos experimentales de la producción de bio-hidrógeno para los diferentes tipos de biomasa estudiadas. Este modelo se ha aplicado anteriormente a los datos experimentales para determinar la cinética de la producción de bio-hidrógeno en las pruebas por lotes (Arooj et al, 2007; Buitrón y Carvajal, 2010).

$$H(t) = H_{max} * \exp \left[-\exp \left(\frac{e * R_{max} (\lambda - t)}{H_{max}} \right) + 1 \right] \quad (3.2)$$

Donde $H(t)$ es el volumen acumulado de la producción de bio-hidrógeno, en mL, durante el tiempo t , en h; H_{max} es el potencial de producción de bio-hidrógeno, en mL; R_{max} es la máxima tasa de producción de bio-hidrógeno, en mL/h; λ es el tiempo de adaptación, en h, antes de que se alcance la producción exponencial de bio-hidrógeno; e es el número de Euler, igual a 2.71828. Los parámetros del modelo de Gompertz se calcularon minimizando la relación existente entre de la suma de mínimos cuadrados y el coeficiente de correlación mediante el uso de la herramienta “Solver” de Microsoft Excel® 2010.

Para comparar el desempeño de las biomásas se calculó la tasa máxima específica de producción de hidrógeno ($TEPH_{max}$) como el cociente de dividir R_{max} entre la concentración de biomasa en las botellas Shott. Asimismo, se calculó el rendimiento máximo de la producción de hidrógeno (Y_{max/H_2}) como el cociente de dividir H_{max} entre los moles de glucosa alimentados.

3.8 BALANCE DE ELECTRONES-EQUIVALENTES

El balance de electrones-equivalentes para evaluar la recuperación de DQO considerando los productos líquidos y gaseosos producidos que se midieron se realizó mediante la metodología propuesta por Lee et al. (2006) (ec. 3.3).

$$DQO_{glucosa,in} = DQO_{glucosa,res} + DQO_{gas} + DQO_{inter} \quad (3.3)$$

Donde $DQO_{glucosa,in}$: mg-DQO de la glucosa inicial; $DQO_{glucosa,res}$: mg-DQO de la glucosa residual; DQO_{gas} : mg-DQO de los productos gaseosos producidos; DQO_{inter} : mg-DQO de los intermediarios solubles producidos tales como el etanol y los ácidos acético, butírico, isobutírico, propiónico y valérico.



CAPÍTULO 4. EFECTO DEL pH INICIAL Y LA ALCALINIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE BIO-HIDRÓGENO

Publicaciones derivadas de este capítulo

Hernández-Mendoza CE, Buitrón G (2010). Efecto del pH inicial en la producción de bio-hidrógeno empleando un consorcio bacteriano sin tratamiento previo. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Junio, 19-24. Querétaro, México.





4.1 INTRODUCCIÓN

El pH inicial (pH_i) es un parámetro que tiene un efecto importante sobre la producción de bio-hidrógeno (Van Ginkel et al., 2001; Wu y Lin, 2004; Lin et al., 2006). El pH influye en la actividad de la enzima hidrogenasa así como en la ruta metabólica de las bacterias presentes en el inóculo. También influye en la selección de los microorganismos presentes en el sistema, e. g. las bacterias productoras de ácido propiónico y las arqueas metanogénicas, cuya actividad se ve afectada a niveles ácidos de pH (Zhou y Ren, 2007; Wang et al., 2006a).

Existe cierto desacuerdo sobre el pH inicial óptimo para la producción fermentativa de hidrógeno. Khanal et al. (2004) indican que el pH inicial óptimo para la producción fermentativa de hidrógeno fue de 4.5, mientras que Lee et al. (2002) indican que el pH inicial óptimo fue de 9.0. Es posible que esta discrepancia se deba al tipo de inóculo, al sustrato y al rango de pH iniciales estudiados.

El nivel del pH y su estabilidad tienen un papel importante debido a que la producción de bio-hidrógeno está acompañada de la producción de AGV, los cuales pueden estimular, inhibir o, incluso, ser tóxicos para las bacterias fermentativas dependiendo de su concentración y la capacidad búfer del medio (Dong et al., 2009). Es posible controlar las variaciones del pH del sistema mediante el incremento de su capacidad búfer, lo cual puede favorecer la producción de bio-hidrógeno incluso a altas concentraciones de AGV (Pandey et al., 2011).

Tanto el nivel de pH como la alcalinidad del medio son importantes en el tratamiento anaerobio debido a que ambos parámetros están relacionados con el control de la acidez derivada del proceso acidogénico. La alcalinidad del medio puede restringir la acumulación de ácidos orgánicos lo cual podría resultar en un nivel de pH tal que se pueda llevar a cabo la producción de bio-hidrógeno junto con la remoción del sustrato durante la fase de crecimiento de la biomasa.

Generalmente, junto con el influente del biorreactor se suministra alguna sustancia búfer para reducir las fluctuaciones de pH durante el periodo inicial de crecimiento de los microorganismos. En los sistemas anaerobios es común el uso de carbonatos como suplementos de alcalinidad. Sin embargo, su uso se correlaciona con la concentración de dióxido de carbono, el cual es uno de los componentes gaseosos obtenidos durante la



producción de bio-hidrógeno, por lo que la adición de carbonatos en un nivel adecuado para el sistema podría incrementar la fracción de hidrógeno presente en el gas producido (Lin y Lay, 2004b).

Una falla en el control de la alcalinidad puede alterar el nivel del pH resultando en una interrupción en la producción de bio-hidrógeno. Debido a esto, el influente debe tener una capacidad búfer suficiente para que pueda mantenerse el nivel de pH requerido para que se pueda llevar a cabo la producción de bio-hidrógeno. A pesar de esto, no hay suficiente información acerca del nivel de alcalinidad adecuado para la producción de bio-hidrógeno durante el tratamiento de efluentes líquidos. (Lin y Lay, 2004b)

El objetivo de este capítulo consistió en evaluar el efecto del pH inicial y determinar la cantidad de alcalinidad adicional que debe suministrarse al biorreactor, junto con la solución de alimentación, para la producción de bio-hidrógeno utilizando lodo anaerobio granular sin tratamiento previo.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos empleados en esta parte de la experimentación son los descritos en el Capítulo 3.

Para evaluar el efecto del pH_i en la producción de bio-hidrógeno se ensayaron tres valores de pH: 5.5 ± 0.1 , 7.0 ± 0.1 y 7.3 ± 0.1 . El pH se ajustó tanto en el influente como dentro del biorreactor al inicio de cada ciclo y se dejó evolucionar libremente con el proceso. Al final de cada lote se ajustó el pH del sistema al nivel deseado. Para cada prueba de pH inicial el biorreactor se inoculó con lodo granular nuevo, evitando con esto el efecto de aclimatación de la biomasa al pH ensayado.

Para evaluar el efecto de la alcalinidad en la producción de bio-hidrógeno se analizaron 2 niveles de alcalinidad, para lo cual se agregó bicarbonato de calcio a la solución de alimentación para obtener una concentración de alcalinidad agregada de 0, 1 y 2.5 g- $CaCO_3/L$. La alcalinidad de la solución de alimentación antes de agregarle bicarbonato de calcio fue de 325 ± 7 mg- $CaCO_3/L$. En todos los casos el pH estuvo controlado a 5.5 ± 0.1 dentro del biorreactor para lo cual se le agregó hidróxido de sodio 2N en función de las necesidades del sistema.



4.3 RESULTADOS

4.3.1 EFECTO DEL pH INICIAL

La Tabla 4.1 presenta los resultados obtenidos para los tres niveles de pH_i ensayados. En general, el contenido de hidrógeno en el biogás disminuyó conforme se incrementó el pH_i. Durante toda la experimentación no se detectó la presencia de metano en el biogás.

Al comienzo del experimento se utilizó un nivel de pH inicial de 5.5 debido a que se ha reportado que éste valor es el óptimo para la producción de bio-hidrógeno cuando se emplea glucosa como fuente de carbono (Fang y Liu, 2002). A este pH la producción de hidrógeno fue inestable y después de cinco días de operación su producción cesó, lo cual se pudo deber a que el metabolismo de las bacterias *Clostridium* depende del nivel de pH en el medio (Kim y Zeikus, 1985). Un comportamiento similar al observado en este estudio se reportó previamente por Roychowdhury et al. (1988).

Tabla 4.1. Producción de bio-hidrógeno a diferentes niveles de pH inicial.

pH _i	pH _f	H ₂ (%)	CO ₂ (%)	TPH ^a (mL-H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹)	Rendimiento (mol H ₂ /mol glucosa alimentada)
5.5 ± 0.1	3.5 ± 0.6	23 ± 25	25 ± 28	32 ± 49	0.3 ± 0.3
7.0 ± 0.1	3.1 ± 0.1	18 ± 13	82 ± 13	22 ± 19	0.4 ± 0.2
7.3 ± 0.1	3.0 ± 0.1	8 ± 3	92 ± 3	12 ± 9	0.2 ± 0.1

Valores en la tabla: promedio ± desviación estándar

^a Valor promedio de la tasa de producción de bio-hidrógeno durante todo el experimento.

Las bacterias del género *Clostridium* pueden crecer a un pH entre 4.5 y 7.0 (Zigova y Sturdik, 2000). Por lo que debido al bajo pH final observado en la condición anterior, se decidió conservar el pH de la solución de alimentación el cual fue de 7.0 ± 0.1. En este caso, la producción de hidrógeno se mantuvo y el rendimiento observado fue mayor al obtenido a un pH_i de 5.5.

Posteriormente se incrementó el nivel de pH a 7.3 debido a que se ha reportado que el uso de pH mayor a 7.5 resulta en una baja producción de bio-hidrógeno (Lin et al., 2006). Para esta condición se observó que el rendimiento de la producción de bio-hidrógeno fue menor que el



observado en la condición anterior. Debido a que el inóculo no recibió tratamiento alguno para inhibir la actividad de los microorganismos consumidores de hidrógeno, es posible que al nivel de pH_i de 7.3 estos microorganismos fueran capaces de consumir una mayor cantidad de hidrógeno que en las condiciones de pH_i anteriores.

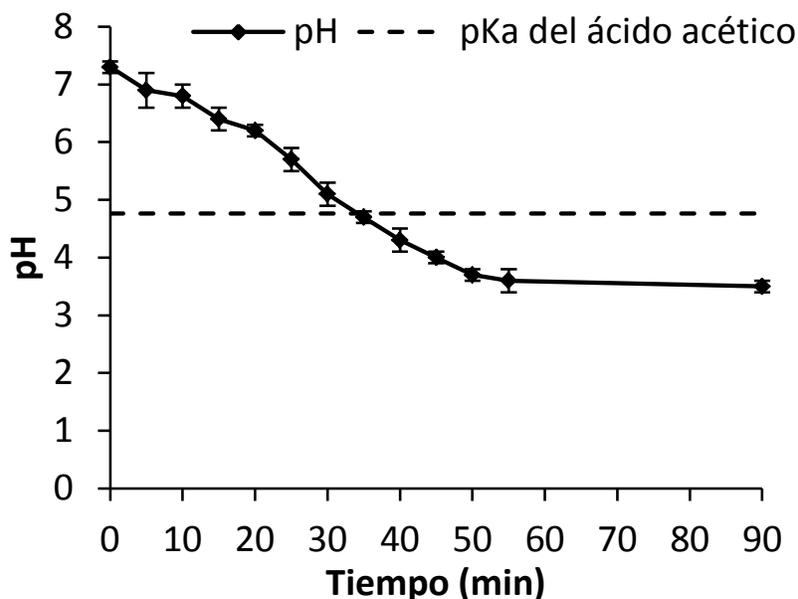


Figura 4.1. Evolución del pH_i de 7.3.

Para conocer la evolución del pH_i en el sistema, se siguió su evolución para la condición de pH_i de 7.3 (Figura 4.1). Se observó que a los 35 minutos de operación del biorreactor el pH del sistema alcanzó un nivel de 4.7 ± 0.1 , mientras que a los 45 minutos de operación el pH del medio alcanzó un nivel de 4.0 ± 0.1 . A un pH extracelular menor a 4.76 (pK_a del ácido acético: 4.76) la cantidad de ácido acético es abundante y se puede permear a través de la membrana celular dañando su funcionamiento (Horn et al., 2003).

4.3.2 EFECTO DE LA ALCALINIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

La Tabla 4.2 presenta la evolución de la producción de biogás a los diferentes niveles de alcalinidad agregada ensayados. En todos los casos el pH se controló a 5.5 ± 0.1 . En general, la mayor concentración de metano se observó en el primer día de operación. Aunque la producción de metano tendió a disminuir conforme se operó el biorreactor, no se suprimió la actividad de los microorganismos productores de metano.



La concentración de dióxido de carbono aumentó conforme se incrementó el nivel de alcalinidad del sistema. Al aumentar la alcalinidad, la concentración del hidrógeno disminuyó pero la concentración de metano se mantuvo estable. No se observó un incremento considerable en la tasa de producción de bio-hidrógeno conforme se aumentó el nivel de alcalinidad del sistema.

Tabla 4.2. Producción de bio-hidrógeno a diferentes niveles de alcalinidad.

Alcalinidad (g-CaCO ₃ /L)	H ₂ (%)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	TPH _{max} (mL-H ₂ L ⁻¹ d ⁻¹)	AGV/alcalinidad	
					Producción estable	Producción inestable
0.325	41 ± 7	32 ± 17	27 ± 3	16.2	1.2 – 2.4	0.4 – 0.3
1.325	17 ± 6	33 ± 18	50 ± 33	16.0	0.9 – 1.2	0.5 – 0.4
2.825	16 ± 7	32 ± 16	52 ± 35	15.8	1.0 – 1.3	0.8 – 0.3

Los principales metabolitos solubles producidos fueron el ácido acético y el ácido butírico. La producción de ácido propiónico tendió a disminuir conforme se fue operando el biorreactor. Aunque se observó la producción de etanol, su concentración fue menor que la de los ácidos producidos. La producción de bio-hidrógeno se volvió inestable conforme la relación AGV/alcalinidad alcanzó valores menores a 0.8. Es posible que los cambios en la concentración de bicarbonato afectaron la concentración de dióxido de carbono y con ello a la producción de bio-hidrógeno (Park et al., 2005).

Leite et al. (2008) determinaron que la alcalinidad afectó la distribución de los productos solubles perturbando a su vez la eficiencia de la producción de hidrógeno. Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo (2009b) reportaron que se requirió un nivel de alcalinidad de 0.2-0.3 g/g de sustrato en base seca, mientras que para niveles de alcalinidad mayores, la producción de bio-hidrógeno se vio afectada negativamente debido a un incremento en la presión osmótica.

4.4 CONCLUSIONES PARCIALES

Se evaluó el efecto del pH inicial y la cantidad de alcalinidad adicional que debe suministrarse al biorreactor, junto con la solución de alimentación, para la producción de bio-hidrógeno utilizando lodo anaerobio granular sin tratamiento previo. Los resultados obtenidos mostraron que a un pH inicial bajo el medio tendió a acidificarse rápidamente, lo cual resultó en la



inhibición de la producción de bio-hidrógeno. Mientras que a un pH inicial alto la producción de hidrógeno se mantuvo a pesar de que el pH del medio tendió a disminuir rápidamente. El nivel de alcalinidad agregado al sistema no tuvo un efecto positivo sobre la producción de bio-hidrógeno. Por lo tanto, el pH inicial de la alimentación debe mantenerse en 7.0 ± 0.1 y no es necesario agregarle bicarbonatos a la solución de alimentación del biorreactor como suplemento del nivel de alcalinidad.



CAPÍTULO 5. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EMPLEANDO DIFERENTES BIOMASAS

Publicaciones derivadas de este capítulo

Hernández-Mendoza CE, Moreno-Andrade I, Buitrón G. Influence of the biomass settleability on bio-hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor. *En preparación*.

Moreno-Andrade I, Hernández-Mendoza CE, Buitrón G (2013). Comparison of bacterial communities producing hydrogen on continuous and discontinuous reactors. 5th. World Hydrogen Technology Conference. September, 25-28. Shanghai, China.

Hernández-Mendoza CE, Moreno-Andrade I, Buitrón G (2011). Evaluation of settleable and non-settleable microorganisms during bio-hydrogen production. Microbes in Wastewater and Waste Treatment, Bioremediation and Energy Production. January, 24-26. Goa, India.

Hernández-Mendoza CE, Moreno-Andrade I, Buitrón G (2010). Influence of biomass stratification on bio-hydrogen production in an anaerobic sequential batch reactor using a mixed culture. 2nd IWA Mexico Young Water Professionals Conference. April, 12-14. Querétaro, México.





5.1 INTRODUCCIÓN

Se ha mostrado que la capacidad de sedimentación de la biomasa afecta a la eficiencia de la producción de hidrógeno (Lin y Jo, 2003). Arooj et al. (2007) encontraron que los microorganismos que no sedimentan, durante la etapa de sedimentación de un biorreactor discontinuo secuencial (SBR por sus siglas en inglés), tienen una capacidad específica para producir hidrógeno mayor que la de los microorganismos que son capaces de sedimentar. Este hallazgo tiene repercusiones muy importantes, ya que de esto dependerá el tipo de microorganismos y la configuración del reactor a emplear. Ya que en un biorreactor SBR, la biomasa que no sedimenta se desecharía del sistema, mientras que en un biorreactor con membranas todos los componentes de la biomasa que sean mayores al tamaño de corte de la membrana quedarían retenidos en el reactor.

El biorreactor SBR es una metodología que opera bajo procesos cíclicos basados en una longitud de tiempo necesario para lograr el nivel de remoción de materia orgánica requerido. Esta metodología se ha empleado para tratar diferentes tipos de agua residual (Ng et al., 2002) así como para producir hidrógeno utilizando diferentes sustratos tales como la sacarosa (Lin y Jo, 2003) y el agua residual de la industria láctea (Mohan et al., 2007). Esta metodología tiene diferentes ventajas sobre otros procesos, tales como alta flexibilidad en la operación, control de la población microbiana y se puede utilizar con diferentes configuraciones de biorreactor (Suresh et al., 2011).

El biorreactor SBR opera bajo cinco etapas bien definidas: llenado, reacción, sedimentación, vaciado y tiempo muerto. La reacción biológica se inicia durante la operación de llenado y continúa durante la etapa de reacción. El mezclado se lleva a cabo hasta el final de la etapa de reacción permitiendo que la biomasa sedimente por gravedad bajo condiciones de reposo, ya que no hay perturbaciones hidráulicas que afecten la sedimentación (Suthaker et al., 1991). Al final de la etapa de sedimentación, el sobrenadante se extrae del biorreactor junto con la biomasa que no sedimentó.

En la naturaleza, los procesos de sedimentación dependen de factores tales como el tamaño y el peso específico de la partícula, su tendencia a formar coágulos, la viscosidad del agua y la carga eléctrica. La sedimentación también está relacionada con la estructura y la naturaleza de los flóculos que a su vez dependen de las condiciones de operación



predominantes en el biorreactor (Andreadakis, 1993). La estabilidad de los flóculos está influenciada por diferentes factores, tales como la cantidad y la composición de las sustancias exopoliméricas (EPS), los cationes, la estructura y la actividad de la comunidad microbiana, así como las fuerzas de interacción entre ellos (Wilén et al., 2003). La naturaleza de los flóculos es heterogénea y tanto el tamaño como la morfología del flóculo puede diferir considerablemente debido a las diferencias o cambios en los parámetros de operación de los sistemas (Wilén et al., 2003).

La mayoría de los ambientes acuáticos contiene tanto biomasa adherida a diferentes partículas como biomasa de crecimiento libre o disperso (Bidle y Fletcher, 1995). Frecuentemente, en los ambientes acuáticos, las bacterias adheridas tienen un tamaño y una concentración relativamente mayor en comparación con las bacterias de vida libre (DeLong, 1993). Sin embargo, respecto al número total de células o al carbono total de las células, la fracción de las bacterias de vida libre es más abundante (Grossart y Simon, 1998; Simon et al., 1990, 2002). No obstante, las tasas de crecimiento específico y de producción de carbono de ambas fracciones de biomasa son equivalentes (Simon et al., 1990).

En los sistemas aerobios, los problemas relacionados con la alta turbiedad del efluente se relacionan con una cantidad relativamente pequeña de biomasa la cual permanece en suspensión (Wilén et al., 2000a). El desprendimiento de los microorganismos del flóculo frecuentemente se relaciona con el estrés microbiano (Gjermansen et al., 2005), las condiciones de fuerza cortante (Mikkelsen y Keiding, 1999), las condiciones del metabolismo específico del sustrato y el donador de electrones (Wilén et al., 2000b). El hecho de que la biomasa suspendida no pueda sedimentar se ha explicado mediante su composición microbiológica (Wilén et al., 2003; Ng y Hermanowicz, 2005; Morgan-Sagustume et al., 2008). Sin embargo, a pesar de su impacto en el desempeño de los sistemas de tratamiento aerobio, así como en los sistemas acuáticos, no se han establecido claramente los mecanismos que expliquen por qué una fracción de lodo tiende a dispersarse y permanecer en suspensión (Wilén et al., 2003; Morgan-Sagustume et al., 2008).

La actividad microbiana puede determinar la estabilidad estructural del flóculo además de catalizar el proceso de biodegradación (Wilén et al., 2000a). La adsorción de los nutrientes entre las bacterias de crecimiento disperso y las bacterias adheridas puede llegar a ser



significativamente diferente entre ambas poblaciones (Kirchman y Mitchell, 1982). En el caso de los reactores aerobios con membranas, se ha reportado que la presencia de los microorganismos que no sedimentan contribuyó a mejorar la remoción de la materia orgánica, debido a que toda la biomasa se retuvo dentro del reactor (Ng y Hermanowicz, 2005; Massé et al., 2006), así como al hecho de que los microorganismos que tienden a crecer de manera dispersa presentan una menor resistencia a la transferencia de masa en comparación con los microorganismos que crecen adheridos, e. g. formando de flóculos (Ng y Hermanowicz, 2005). El objetivo de este capítulo fue evaluar la capacidad específica de producción de hidrógeno de los microorganismos que sedimentan (biomasa sedimentable) y de los microorganismos que no sedimentan (biomasa no sedimentable) mediante pruebas bioquímicas de producción de hidrógeno.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos empleados en esta parte de la experimentación son los descritos en el Capítulo 3.

La biomasa flocular, tratada térmicamente antes de su uso, se aclimató en un biorreactor SBR con un volumen nominal de 6 L, un volumen de trabajo de 4 L y se operó a un TRH de 24 h y un pH de 5.5 ± 0.1 dentro del biorreactor. Posteriormente se llevó a cabo la separación de la biomasa, en sedimentable y no sedimentable, para lo cual se incrementó el tiempo de sedimentación de 30 min a 3 h. Este incremento se debe a que Arooj et al. (2007) indicaron que la biomasa que no sedimenta después de 3 h presenta una actividad específica de producción de hidrógeno mayor que la biomasa que es capaz de sedimentar. Durante la etapa de separación de la biomasa el TRH se mantuvo en 24 h y el biorreactor se operó de la siguiente forma: tiempo de llenado 3 min, tiempo de reacción 515 min, tiempo de sedimentación 180 min, tiempo de vaciado 8 min, tiempo muerto 11 min. La longitud del ciclo fue de 12 h y la relación tiempo de reacción/tiempo de sedimentación fue de 3.

Las muestras de biomasa se obtuvieron después de la etapa de sedimentación, es decir, antes de volver a alimentar al biorreactor. Los microorganismos que sedimentan se retuvieron en el fondo del biorreactor y se extrajeron directamente empleando una manguera instalada en el fondo del mismo. Los microorganismos que no sedimentaron se obtuvieron del efluente del biorreactor durante la etapa de vaciado. El sobrenadante se centrifugó a 630 g durante 5 min



para obtener una pastilla de biomasa no sedimentable, la cual se volvió a suspender en el medio de cultivo. Las pruebas bioquímicas de producción de hidrógeno de los microorganismos que sedimentan y que no sedimentan se realizaron por triplicado, tal como se indica en el Capítulo 3.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 ACLIMATACIÓN DE LA BIOMASA FLOCULAR

La Figura 5.1 muestra la evolución de la producción de bio-hidrógeno durante la etapa de aclimatación de la biomasa flocular.

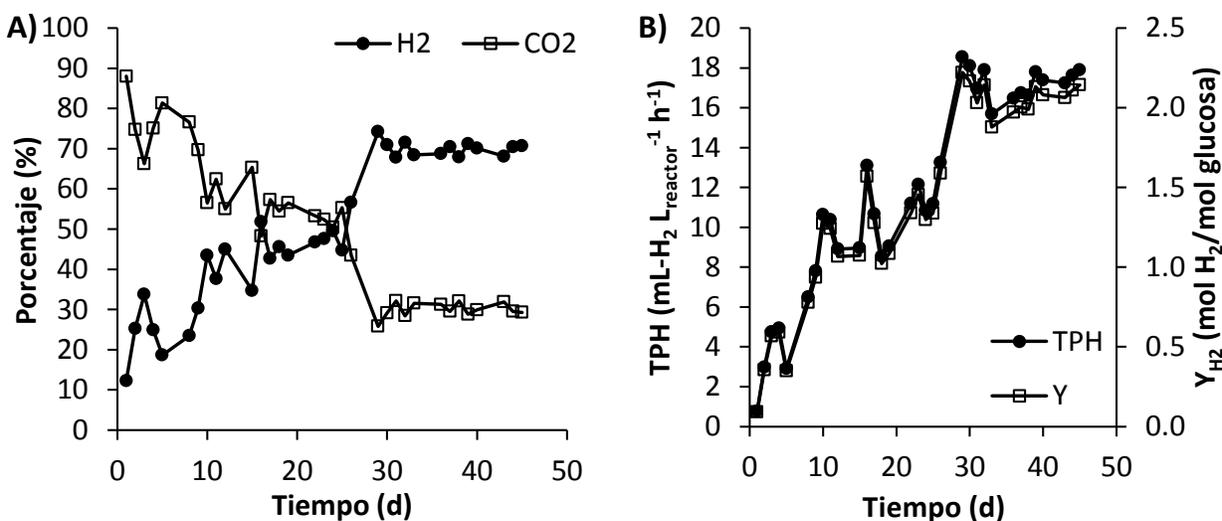


Figura 5.1. Desempeño del biorreactor durante la etapa de aclimatación del inóculo. A) Composición del biogás, B) rendimiento (Y_{H_2}) y tasa de producción (TPH) de hidrógeno.

No se detectó metano durante todo el experimento debido a la supresión de las arqueas metanogénicas por el tratamiento térmico aplicado (Van Ginkel et al., 2001). A partir del día 30 el contenido de hidrógeno en el biogás alcanzó el estado estacionario con una concentración media de $70\% \pm 2\%$. Este contenido de hidrógeno en el biogás se ha observado previamente (Kim et al, 2008; Won y Lau, 2011). La tasa de producción de bio-hidrógeno (TPH) tendió a aumentar a medida que la biomasa se aclimató. En el estado estacionario la TPH y el rendimiento (Y_{H_2}) fueron de 17.2 ± 0.7 mL-H₂ L⁻¹ h⁻¹ y 2.1 ± 0.1 mol H₂/mol glucosa_{agregada}, respectivamente.



5.3.2 DESEMPEÑO DE LOS MICROORGANISMOS QUE SEDIMENTAN Y QUE NO SEDIMENTAN

Durante las primeras horas de la prueba ambos tipos de microorganismos presentaron una producción de biogás similar. Sin embargo, después de 3 horas la producción de biogás obtenida con la biomasa no sedimentable (5.0 ± 0.2 mmol) fue significativamente mayor (ANOVA, $\alpha = 0.05$) que la obtenida con la biomasa sedimentable (4.0 ± 0.2 mmol). Esto se atribuyó a que los microorganismos que crecen de manera dispersa presentan una limitación menor a la transferencia de masa, mientras que los microorganismos que crecen adheridos, están sujetos a una concentración de sustrato menor que la de la solución alimentada (Ng y Hermanowicz, 2005; Massé et al., 2006). No obstante, el contenido de hidrógeno en el biogás producido por la biomasa sedimentable fue significativamente mayor ($42\% \pm 5\%$) que la concentración de hidrógeno en el biogás producido por la biomasa no sedimentable ($17\% \pm 4\%$) el cual tuvo un alto contenido de CO_2 .

La Tabla 5.1 presenta los parámetros cinéticos obtenidos a partir del ajuste del modelo de Gompertz a la producción de bio-hidrógeno observada por ambos tipos de microorganismos. En general, el modelo de Gompertz describió adecuadamente a la producción de bio-hidrógeno debido a que los coeficientes de correlación (r^2) fueron superiores a 0.90 (Buitrón y Carvajal, 2010).

Tabla 5.1. Parámetros del modelo de Gompertz ajustado a la producción de hidrógeno por los microorganismos sedimentables y no sedimentables.

Microorganismos	r^2	H_{\max} (mL_{H_2})	R_{\max} ($\text{mL}_{\text{H}_2}/\text{h}$)	TEPH_{\max} ($\text{mL}_{\text{H}_2} \text{g-SSV}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Y_{\max/H_2} ($\text{mol H}_2/\text{mol}$ glucosa _{agregada})
Sedimentables	0.98	40 ± 2	52 ± 3	26 ± 2	1.32 ± 0.04
No Sedimentables	0.95	17 ± 1	13 ± 1	7 ± 1	0.60 ± 0.01

Los microorganismos que sedimentan mostraron una tasa de producción de hidrógeno máxima (R_{\max}) 4 veces mayor que la de los microorganismos que no sedimentan. Además, su tasa de producción específica (TPEH_{\max} : $25 \text{ mL-H}_2 \text{ g-SSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$) fue significativamente mayor que la de los microorganismos que no sedimentan (TPEH_{\max} : $6 \text{ mL-H}_2 \text{ g-SSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

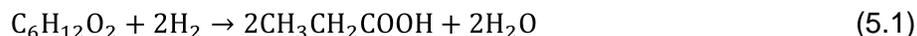


Los resultados obtenidos en este estudio contrastan con los reportados por Arooj et al. (2007) quienes indicaron que los microorganismos que no sedimentaban, después de un tiempo de sedimentación de 3 h, tenían una capacidad específica de producción de hidrógeno mayor que los microorganismos que sedimentaban. El contraste con los resultados aquí obtenidos se puede atribuir a la forma en la cual se aclimató la biomasa y a que la relación entre el tiempo de reacción y el tiempo de sedimentación empleada fue mayor, la cual se ha reportado que puede aumentar la eficiencia de la producción de hidrógeno de la biomasa que sedimenta (Lin y Jo, 2003).

5.3.3 DISTRIBUCIÓN DE LOS METABOLITOS PRODUCIDOS

Los metabolitos solubles producidos por ambos tipos de microorganismos siguieron una distribución similar (Figura 5.2). En el caso del reactor inoculado con biomasa sedimentable el ácido butírico representó el 41%, seguido del ácido acético (39%), ácido propiónico (10%) y etanol (10%). Esta distribución de los metabolitos solubles producidos indica que el metabolismo predominante fue el de la fermentación del tipo butirato-acetato (Kim et al., 2004; Mu et al., 2006), la cual se caracteriza por la producción de butirato, acetato, dióxido de carbono e hidrógeno (Ren et al., 2007). Es posible que algunos microorganismos del género *Clostridium* fueran las especies dominantes en el sistema inoculado con la biomasa sedimentable debido a que éstos microorganismos son los principales responsables de la fermentación del tipo butirato-acetato (Dinopoulou et al., 1988; Zajic et al., 1978)

En el caso de la biomasa no sedimentable el principal metabolito producido fue el ácido butírico (38%), seguido del ácido acético (36%), ácido propiónico (16%) y etanol (10%). Debido a la distribución de los metabolitos solubles, la producción de hidrógeno estuvo asociada a la producción de ácido butírico. En este caso, se observa un incremento en la producción de ácido propiónico, respecto a lo obtenido en el sistema con la biomasa sedimentable. La fermentación del tipo propionato produce, principalmente, propionato, acetato y algo de valerato sin una producción significativa de gas (Ren et al., 2007). Estequiométricamente, la producción de ácido propiónico está relacionada con el consumo de dos moles de hidrógeno por cada 2 moles de ácido propiónico producido (ec. 5.1), por lo que su presencia en el sistema se relaciona con una disminución en la producción de bio-hidrógeno (De Amorim et al., 2012).



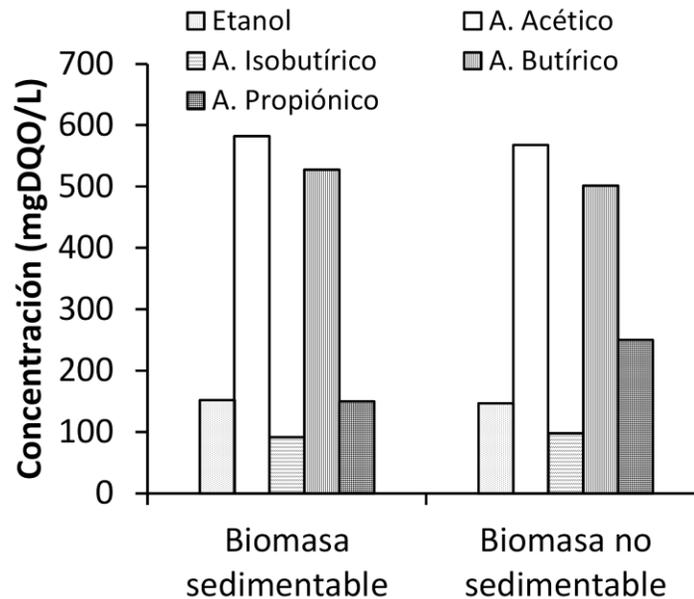


Figura 5.2. Distribución de los metabolitos solubles producidos por la biomasa sedimentable y no sedimentable.

Es posible que la diferencia en la producción de hidrógeno con ambas biomásas se pueda encontrar en la distribución de los metabolitos solubles, ya que los microorganismos que llevan a cabo la fermentación del tipo butirato-acetato compiten por el sustrato con los microorganismos que llevan a cabo la fermentación del tipo propionato, la cual no produce hidrógeno (McCarty y Mosey, 1991). Esto a su vez se encuentra relacionado con el metabolismo de las especies microbianas presentes en las dos fracciones de biomasa, ya que la adsorción celular de los nutrientes, tales como los azúcares y los aminoácidos, en las comunidades de bacterias adheridas es significativamente mayor que en las bacterias de vida libre (Kirchman y Mitchell, 1982; Smith et al., 1995).

La proliferación de los microorganismos de vida libre, tanto en los biorreactores anaerobios SBR para la producción de hidrógeno (Arooj et al., 2007) como en los sistemas aerobios (Ng y Hermanowicz, 2005; Massé et al., 2006), probablemente se debe a que las bacterias adheridas hidrolizan más materia orgánica de la que ocupan, lo que implica que una gran parte de la materia orgánica particulada sirve para proporcionarle a las bacterias de vida libre la materia orgánica y nutrientes disueltos que requieren, lo cual estimula el crecimiento de las bacterias de vida libre (Grossart y Simon, 1998).



5.3.4 ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS

Los microorganismos sedimentables (Figura 5.3A) mostraron un color café claro, con un patrón de crecimiento de tipo flocular. La biomasa no sedimentable (Figura 5.3B) presentó un color blanco, con un patrón de crecimiento disperso. Ambos tipos de biomasa estuvieron formadas principalmente por microorganismos con forma de bacilos y cocos.

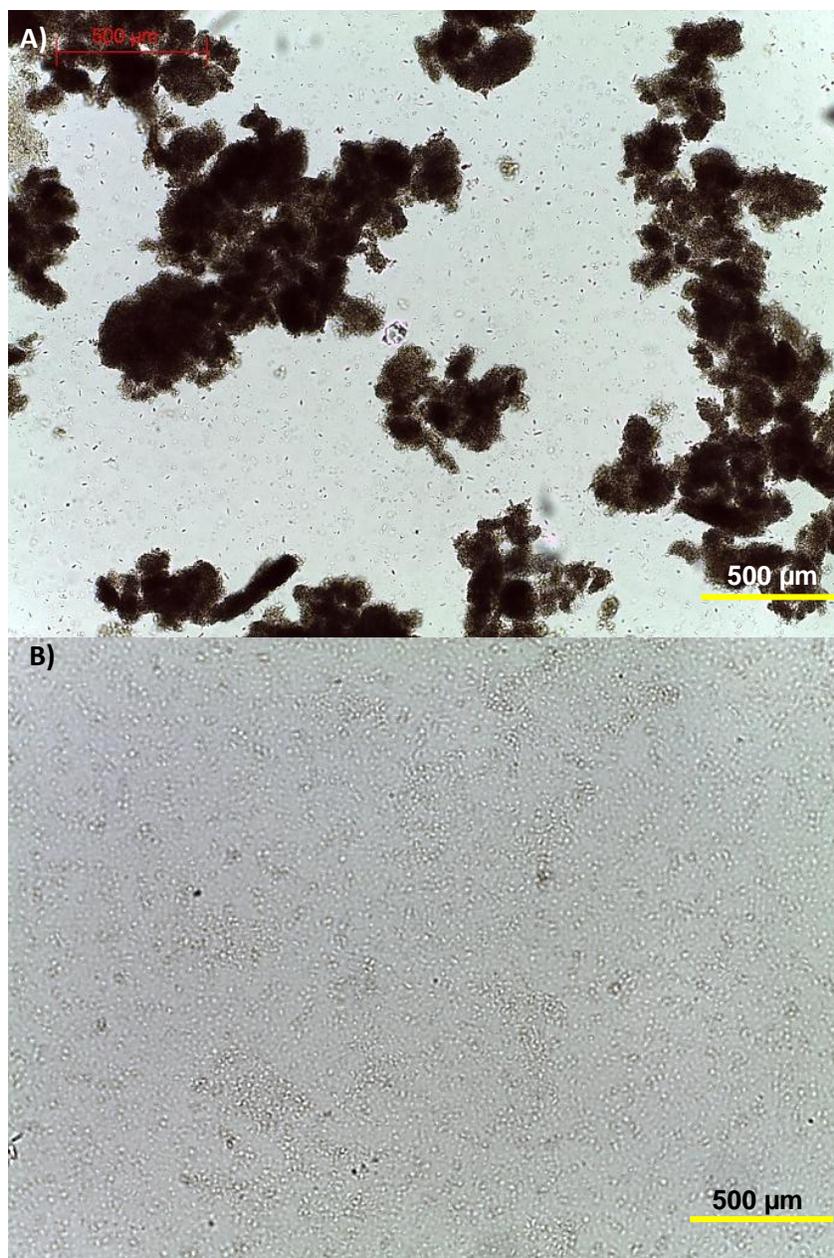


Figura 5.3. Microorganismos observados a una amplificación de 10x. A) Biomasa sedimentable y B) biomasa no sedimentable.

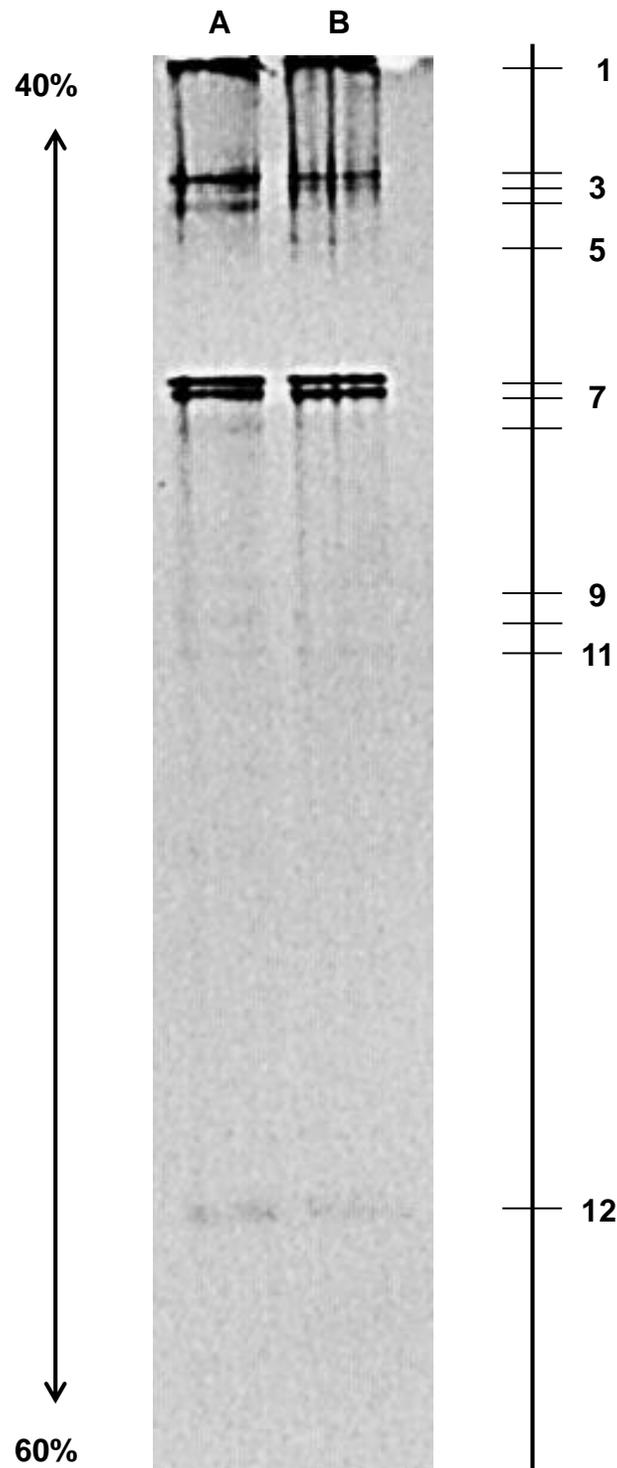


Figura 5.4. Perfiles de la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) de la biomasa que A) no sedimenta y B) que sedimenta.



La Figura 5.4 muestra el perfil del análisis de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante de la biomasa sedimentable y no sedimentable. En total se observaron 12 bandas. La biomasa no sedimentable presentó 11 bandas mientras que la biomasa sedimentable presentó 10 bandas. Las principales diferencias entre ambas muestras (biomasa sedimentable y no sedimentable) fue la presencia del filotipo correspondiente a la banda 5 en la biomasa sedimentable y el filotipo correspondiente a la banda 8 en la biomasa no sedimentable, así como diferencias en la intensidad de las bandas 4 y 12.

La evaluación de la similitud entre las bandas de DGGE de las dos fracciones de lodo se realizó mediante el índice de diversidad de Jaccard. Conforme este índice se acerca al valor de 1.0 implica que las comunidades bacterianas analizadas son cada vez más similares. El valor obtenido mediante el análisis del índice de Jaccard (0.909) indica que las comunidades presentes en ambas fracciones de lodo tienen una diversidad similar. A pesar de esto, la diferencia en la abundancia relativa de algunos filotipos, observada a través de la intensidad de las bandas, entre ambas fracciones de lodo resultó en estructuras microbianas con diferentes metabolismos (Kirchman y Mitchell, 1982) y propiedades de agregación (Morgan-Sagustume et al., 2008).

De acuerdo a lo reportado en la literatura, es probable que algunos microorganismos del género *Clostridium* estuvieran en ambos sistemas. La diferencia entre el metabolismo de las diferentes especies de *Clostridium* pudo haber sido una de las causas en la diferencia de producción de hidrógeno por ambas fracciones de biomasa. Se sabe que los principales subproductos producidos por las bacterias *Clostridium* son el butirato, el acetato, el propionato, el succinato, la acetona, el etanol, el butanol y el isopropanol (Madigan et al., 2009). Algunas especies de *Clostridium* tales como la *C. butyricum*, *C. acetobutyricum* y *C. pasteurianum* pueden producir hidrógeno y dióxido de carbono junto con la producción de butirato, acetato y etanol (Madigan et al., 2009). Por otra parte, la especie *C. propionicum* produce propionato, acetato y dióxido de carbono, mientras que la *C. aceticum* puede sintetizar el acetato a partir del dióxido de carbono (Madigan et al., 2009). Sin embargo, debido a que la identificación de las afiliaciones de los diferentes filotipos encontrados no estuvo dentro del alcance de este estudio, no fue posible llevar a cabo dicha identificación.



5.3.5 BALANCE DE ELECTRONES-EQUIVALENTES

La Tabla 5.2 presenta el balance de electrones-equivalentes para las diferentes biomosas estudiadas. Para la biomasa flocular, el balance de masas indicó que el 101% de la DQO, calculada como electrones-equivalentes, se midió en los experimentos realizados con la biomasa sedimentable, mientras que el 99% de los electrones-equivalentes se recuperaron en los ensayos realizados con la biomasa no sedimentable.

Tabla 5.2. Balance electrones-equivalentes para las diferentes biomosas probadas.

Biomasa	DQO glucosa alimentada ^a	DQO del H ₂ ^b	DQO de los intermediarios totales ^c	Suma de la DQO ^d	Electrones equivalentes no medidos ^e
Sedimentable	256	28	180	208	19%
No sedimentable	256	13	188	201	22%

Los valores en la tabla están expresados en mg-DQO excepto cuando se indican otras unidades

^a Calculado como [mg-DQO L⁻¹ de glucosa alimentada] x 0.15 L

^b Calculado como [mol H₂/mol glucosa] x mol de glucosa alimentada x [16 g-DQO/mol H₂] x 1000 mg/g

^c Calculado como [suma de los mg-DQO L⁻¹ de los AGV y el etanol] x 0.15 L

^d Calculado como la suma en mg-DQO del H₂ y los intermediarios totales de las columnas anteriores

^e Calculado como [DQO de la glucosa alimentada – Suma de la DQO] / DQO de la glucosa alimentada x 100%

Dado que la biomasa sedimentable presentó un buen desempeño para la producción de hidrógeno, es posible que su agrupamiento en forma de gránulos pueda favorecer la velocidad de producción de hidrógeno. Debido a esto, resulta necesario la evaluación del desempeño de la biomasa granular para la producción de hidrógeno.



5.3.6 BIOMASA GRANULAR

El inóculo empleado no recibió tratamiento previo alguno, su densidad fue de 1.01 kg/L y presentaron un diámetro en el rango de 0.5 – 2.5 mm. Su geometría fue aproximadamente circular, con un color negro representativo de los gránulos anaerobios productores de metano.

La producción de biogás fue de 4.2 ± 0.1 mmol con un contenido de hidrógeno del $71\% \pm 3\%$. Durante el experimento no se detectó la presencia de gas metano. Lo anterior se atribuyó a que el pH del medio descendió hasta un valor de 4.3 ± 0.1 , el cual se mantuvo dentro del biorreactor, por lo que no se permitió la activación de las arqueas metanogénicas.

El balance de electrones-equivalentes mostró que la recuperación de la DQO fue del 108%. La distribución de los metabolitos solubles producidos se muestra en la Figura 5.5. El principal metabolito producido fue el ácido butírico seguido del ácido acético y el etanol. La baja producción de ácido propiónico se atribuyó a la sensibilidad de los microorganismos productores de ácido propiónico al bajo pH en el sistema (Wang et al., 2006a).

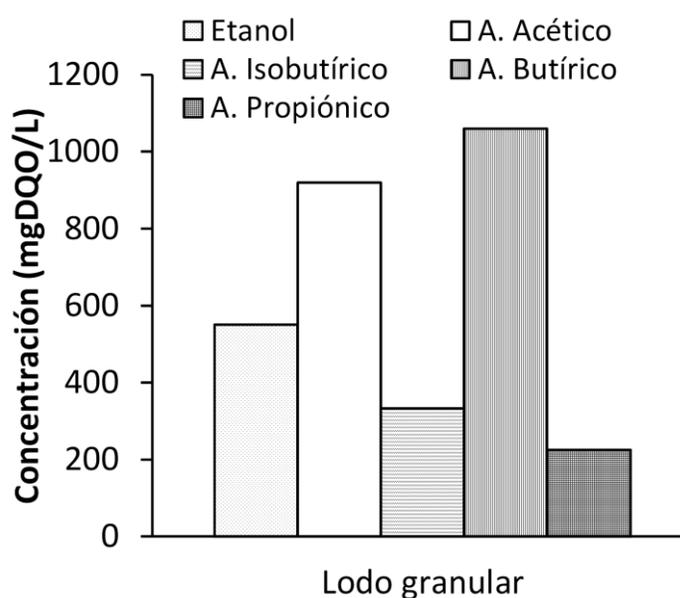


Figura 5.5. Distribución de metabolitos solubles producidos por el lodo granular.

Los parámetros cinéticos obtenidos a partir del ajuste del modelo de Gompertz a la producción de bio-hidrógeno se resumen en la Tabla 5.3. El lodo granular mostró una producción potencial de hidrógeno ($H_{\max} = 66 \pm 0.02$ mL_{H₂}) 1.7 veces mayor al obtenido con la biomasa sedimentable. La tasa máxima de producción de bio-hidrógeno ($R_{\max} = 111 \pm 1$ mL_{H₂}/h)



del lodo granular fue 1.2 veces más grande que el de la biomasa sedimentable. Aunque la biomasa sedimentable tuvo un rendimiento (1.32 ± 0.04 mol H_2 /mol glucosa_{agregada}) mayor que el obtenido con el lodo granular (1.11 ± 0.01 mol H_2 /mol glucosa_{agregada}), la TEPH (28 ± 0.28 mL H_2 g-SSV⁻¹ h⁻¹) del lodo granular fue 12% mayor que la obtenida con la biomasa sedimentable. Debíó a esto, se considera más adecuado el uso de lodo anaerobio granular, como fuente de inóculo, para el resto de los experimentos.

La diferencia en la producción de hidrógeno obtenida para los diferentes tipos de biomasa estudiadas (biomasa sedimentable, biomasa no sedimentable y lodo granular) se puede deber al tipo de microorganismos establecidos en los diferentes sistemas. Dado que en el caso del lodo granular no se le trato térmicamente antes de su uso, la diversidad biológica y el metabolismo establecido en el reactor pudieron haber favorecido la producción de hidrógeno. Esto se debe a que el tratamiento térmico del inóculo resulta en una fuerte e inmediata disminución de la diversidad bacteriana del lodo granular debido a la supresión tanto de los microorganismos consumidores de hidrógeno (i. e. arqueas metanogénicas) como de otras bacterias que no son capaces de esporular, alterando, de esta forma, la estructura de la comunidad microbiana y la morfología del gránulo (Abreu et al., 2011).

La operación exitosa de cualquier biorreactor productor de hidrógeno depende fuertemente del desempeño de los microorganismos presentes en el sistema (Hung et al., 2011). La mayoría de los estudios han empleado lodo anaerobio previamente tratado para producir hidrógeno. Sin embargo, no resulta claro si el tratamiento de la biota natural del inóculo es la forma más eficiente para obtener un inóculo productor de hidrógeno debido a la alteración que sufre la estructura microbiana durante los procesos de tratamiento.

Es posible que el buen desempeño del lodo granular para la producción de hidrógeno se haya debido a que no se modificó la estructura original de la comunidad bacteriana mediante el uso de algún tratamiento previo, por lo que se mantuvo no sólo a los microorganismos principalmente señalados como responsables de la producción de hidrógeno en la literatura (*Clostridium*), sino que también se mantuvo a los microorganismos que de alguna manera intervienen en el proceso, ya sea mediante la hidrólisis del sustrato o, incluso, consumiendo el oxígeno que pudiera haber estado dentro del sistema. Así, la diversidad microbiológica presente en el sistema, bajos las condiciones de operación prevalecientes, propició el desarrollo de un



metabolismo tal que favoreció la producción de hidrógeno, lo cual posiblemente no sucedió en el caso del lodo con tratamiento térmico, puesto que el buen desempeño de la biomasa también depende de la interacción que se llegue a dar entre los diversos microorganismos presentes en el sistema.

La mayoría de los estudios relacionados con la producción de hidrógeno se han enfocado en los microorganismos productores de hidrógeno predominantes, i. e. *Clostridium* y *Enterobacter*. Sin embargo, no se ha definido si la interacción de toda la comunidad microbiana presente en el inóculo puede tener efectos positivos o negativos sobre la producción neta de hidrógeno. Además de la presencia de *Clostridium* y *Enterobacter*, diversos estudios han reportado la presencia de *Selenomonas sp.*, *Acetanaerobacterium elongatum*, *Ethanoligenens harbinense*, *Megasphaera cerevisiae*, a los cuales se les ha relacionado con la producción de hidrógeno. Por otra parte, también se ha reportado la presencia de microorganismos tales como *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella sp.*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas sp.*, *Burkholderia cepacia*, a las cuales se les ha atribuido la función de mantener la condición de anaerobiosis estricta, lo cual favorece a la producción de hidrógeno. Por lo tanto, la diversidad en la comunidad microbiana establecida en el reactor productor de hidrógeno tiene un papel importante debido a que su interacción puede favorecer a la producción de hidrógeno. (Hung et al., 2011)

5.4 CONCLUSIONES PARCIALES

Se evaluó la capacidad específica de producción de hidrógeno de los microorganismos que sedimentan (biomasa sedimentable) y de los microorganismos que no sedimentan (biomasa no sedimentable) mediante pruebas bioquímicas de producción de hidrógeno y se encontró que la biomasa que sedimentó tuvo una capacidad específica de producción de hidrógeno mayor que la de la biomasa que no sedimentó. Este resultado dio pie para la evaluación del desempeño del lodo granular y se obtuvo que éste presentó una velocidad de producción específica de hidrógeno mayor que la obtenida con la biomasa sedimentable. Por lo tanto, resulta más adecuado el uso de lodo granular sin tratamiento previo como fuente de inóculo para el proceso productor de hidrógeno.



CAPÍTULO 6.
SUPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD METANOGENICA
SOBRE LODO GRANULAR ANAEROBIO PARA LA
GENERACIÓN DE INÓCULO PRODUCTOR
DE HIDRÓGENO

Publicaciones derivadas de este capítulo

Hernández-Mendoza CE, Buitrón G (2013). Suppression of methanogenic activity in anaerobic granular biomass for hydrogen production. Int J Chem Technol Biotechnol. Doi: 10.1002/jctb.4143



Capítulo 6. Supresión de la Actividad Metanogénica sobre Lodo Granular Anaerobio para la Generación de Inóculo Productor de Hidrógeno



6.1 INTRODUCCIÓN

El enriquecimiento de bacterias productoras de hidrógeno es un paso crítico en el proceso de arranque del biorreactor. Uno de los principales inconvenientes en el uso de cultivos bacterianos mixtos es la presencia de microorganismos consumidores de hidrógeno y subsecuente producción de metano (Wang y Wan, 2009).

En relación con el desarrollo de microorganismos metanogénicos el tipo de empaque del biorreactor ha demostrado que tiene un papel importante. Se ha reportado que el uso de carbón activado favorece su colonización por microorganismos productores de metano (Schmidt y Ahring, 1999), contrariamente a lo que se ha observado con el uso de cubos cerámicos (Bertin et al., 2010).

En particular, la porosidad del material de empaque adoptado afecta a la especiación de los microorganismos dentro del biorreactor, ya que muy probablemente afecta a la formación de capas. Sin embargo, se ha reportado que la presencia o ausencia del material de empaque por sí mismo (biomasa inmovilizada en comparación con la biomasa en suspensión), en los procesos operados con los mismos parámetros físicos y la misma agua residual, han mostrado favorecer el desarrollo de bacterias consumidoras de hidrógeno. Se ha observado que cuando se permite el desarrollo de una biopelícula sobre un soporte, la actividad de las bacterias consumidoras de hidrógeno es más importante en comparación con lo observado en cultivos suspendidos (Scoma et al., 2011).

Se han desarrollado varios métodos de tratamiento para inactivar a los microorganismos consumidores de hidrógeno. Los tratamientos más comunes utilizan choque térmico (Wang y Wan, 2009), sustancias químicas (Ye et al., 1999) o ácidos/bases fuertes (Cheong y Hansen, 2006). Algunos de ellos se basan en la premisa de que las bacterias productoras de hidrógeno (principalmente las del género *Clostridium*) pueden esporular en ambientes adversos y se reactivan cuando se les proporcionan las condiciones adecuadas (Mohan, 2008; Wang et al., 2011). En el caso de los tratamientos químicos (como el uso de iodopropano y sal ácida de 2-bromoetanosulfonato) hay una inhibición de la metil-coenzima M reductasa, componente clave para la metanogénesis (Ye et al., 1999; Mohan et al., 2008).



Estos métodos se pueden utilizar a escala de laboratorio, pero pueden ser limitativos y poco prácticos para su uso a gran escala (Shizas y Bagley, 2005). Incluso, se ha reportado que el uso de algunos de estos tratamientos afecta a la estructura y la microbiología del lodo granular (Abreu et al, 2011). Por lo tanto, resulta necesaria la obtención de un inóculo productor de hidrógeno por un método más práctico.

Una forma de lograrlo consiste en lavar a los microorganismos consumidores de hidrógeno (e. g., los microorganismos productores de ácido propiónico y metano) mediante el uso de TRH cortos (Ueno et al., 1996; Zhang et al., 2006b) y pH bajos (Wang et al., 2006a; Zhou y Ren, 2007) como un método de selección microbiana, permitiendo que ciertos microorganismos permanezcan dentro del biorreactor.

Se ha reportado el uso de lodo anaerobio granular sin tratamiento para la producción de hidrógeno. Shizas y Bagley (2005) encontraron que la operación de un biorreactor a pH bajo (5.5) y tiempo de retención de sólidos de 10 h no fue suficiente para suprimir la actividad de los microorganismos metanogénicos en el inóculo empleado por más de una semana. Después de 24 días la producción de bio-hidrógeno disminuyó y el contenido de metano en el biogás fue de 20% - 30%.

Sin embargo, se ha reportado que los microorganismos metanogénicos, los cuales tienen tasas de crecimiento menores que las bacterias productoras de hidrógeno, se pueden controlar cuando se usan TRH cortos (Jung et al., 2011; Yang et al., 1997). Es posible aplicar altas cargas hidráulicas cuando se emplean gránulos anaerobios para producir hidrógeno (Lee et al., 2004). Los gránulos resisten el lavado del biorreactor debido a su gran tamaño de partícula (Seghezzo et al., 1998; Pol et al., 2004). Aunque los gránulos anaerobios se forman principalmente en biorreactores UASB también se pueden formar en biorreactores SBR (Ong et al., 2002).

Aunque los gránulos anaerobios se han empleado principalmente en los procesos metanogénicos, también se han utilizado para la producción de hidrógeno (Lee et al., 2004), pero una limitación importante es la longitud de tiempo requerido para su obtención. Mu y Yu (2006b) obtuvieron gránulos estables (con diámetros de 1.0 a 3.5 mm) a partir de lodos en suspensión después de 230 días de operación. Chang y Lin (2004) utilizaron lodo con tratamiento térmico para formar gránulos productores de hidrógeno. Estos investigadores



observaron que la biomasa comenzaba a granular después de 120 días de operación, alcanzando un diámetro máximo de 0.43 mm después de 173 días de operación.

En otro estudio, Fang et al. (2002b) obtuvieron gránulos visibles después de 15 días de operación, los cuales crecieron rápidamente después de 60 días, alcanzando diámetros en el intervalo de 1.3 a 1.9 mm. También se ha estudiado el enriquecimiento de las bacterias productoras de hidrógeno a partir de gránulos anaerobios utilizando temperaturas hipertermófilicas (Kotsopoulos et al., 2006) o con la ayuda de cloroformo (Hu y Chen, 2008), como métodos de tratamiento. Sin embargo, la actividad metanogénica no se suprimió por completo.

El objetivo de este capítulo fue evaluar una metodología para la adaptación de los gránulos anaerobios que permita suprimir su actividad metanogénica y favorezca la producción de hidrógeno. Además, se observó la estabilidad del sistema productor de bio-hidrógeno después de la adaptación de los gránulos anaerobios.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos empleados en esta parte de la experimentación son los descritos en el Capítulo 3.

Los gránulos anaerobios se tamizaron a través de una malla para lograr un diámetro promedio de 2.0 ± 0.2 mm. El inóculo presentó una densidad de 1.012 kg/L con una velocidad de sedimentación de 2.2 ± 0.4 cm/s. El experimento se realizó en dos etapas: una etapa de exploración, llevada a cabo en modo discontinuo y en modo continuo, y una etapa de evaluación de la estabilidad de la producción continua de hidrógeno.

En la etapa de exploración realizada en modo discontinuo, se utilizó un biorreactor discontinuo secuencial con un volumen de trabajo de 1.0 L operado bajo tres TRH (24, 12, y 6 h), comenzando por el TRH de 24 h, y un pH de 5.5 ± 0.1 . A partir de los resultados obtenidos bajo esta condición, se empleó un biorreactor UASB con un volumen nominal de 3.0 L y un volumen de trabajo de 2.0 L operado en modo continuo bajo condiciones más críticas (TRH de 5.5 h y pH 4.5 ± 0.1). El biorreactor se inoculó con lodo nuevo sin tratamiento ni aclimatación previa.



Dado que se suprimió la actividad metanogénica bajo la condición de operación en continuo, el biorreactor se operó durante otros 49 días para evaluar la estabilidad de la producción de hidrógeno.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 PRUEBAS PRELIMINARES

6.3.1.1 DESEMPEÑO DEL BIORREACTOR

En las dos metodologías desarrolladas, los gránulos inoculados tuvieron un diámetro promedio de 2.0 ± 0.2 mm, con un color negro y una consistencia firme. En la metodología de adaptación en discontinuo se evaluaron tres TRH. Los mayores cambios se observaron para el TRH de 6 h. Para esta condición, se observó que el diámetro de los gránulos se redujo de 2.0 ± 0.2 mm a 1.6 ± 0.3 mm. Los gránulos microbianos presentaron un color predominantemente café con algunos gránulos de color negro.

La Figura 6.1 muestra la evolución de los gránulos anaerobios durante la operación discontinua teñidos con los marcadores fluorescentes. Las células se distribuyeron a lo largo del gránulo formando capas. A medida que el TRH se redujo de 24 h a 6 h, la distribución de las células fue más uniforme (Figura 6.1A, 6.1B, y 6.1C). A un TRH de 24 h los β -polisacáridos se distribuyeron principalmente en el centro del gránulo (Figura 6.1D), pero su distribución fue más homogénea a lo largo de la estructura de gránulo conforme se redujo el TRH (Figura 6.1E y 6.1F).

La composición del biogás obtenido durante la adaptación discontinua de los gránulos anaerobios se muestra en la Figura 6.2A. En general, el contenido de metano en el biogás disminuyó a medida que el TRH se redujo, mientras que el rendimiento de la producción de hidrógeno (Y_{H_2}) se incrementó. El contenido promedio de metano en el biogás fue de $32\% \pm 25\%$, $18\% \pm 7\%$ y $13\% \pm 2\%$ para los TRH de 24, 12 y 6 h, respectivamente. El Y_{H_2} para los TRH de 24, 12 y 6 h fue de 0.4 mol H_2 /mol glucosa, 0.8 mol H_2 /mol glucosa y 1.4 mol H_2 /mol glucosa.

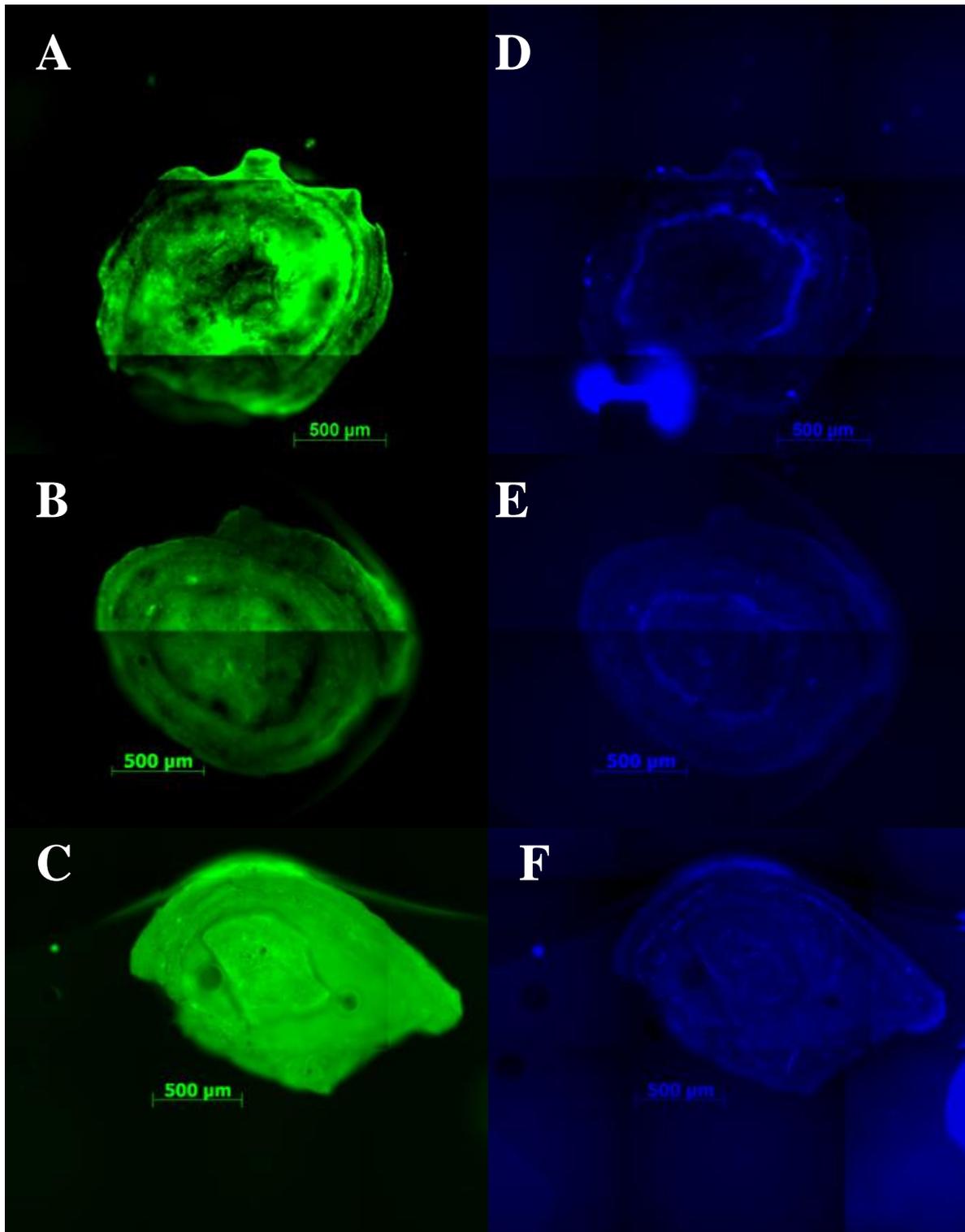


Figura 6.1. Gránulos teñidos obtenidos a diferentes TRH. Células teñidas a un TRH de: A) 24 h, B) 12 h y C) 6 h-TRH. β -polisacáridos teñidos a un TRH de: D) 24 h, E) 12 h y F) 6 h.

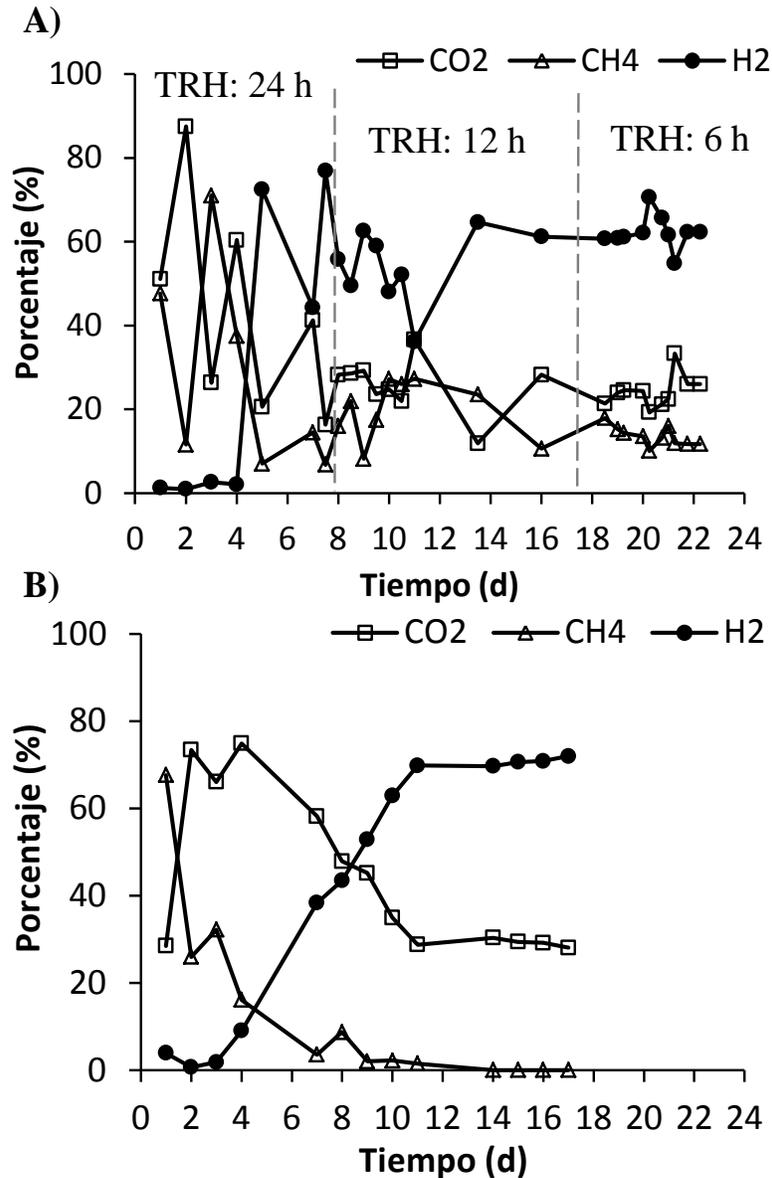


Figura 6.2. Evolución del biogás producido durante la adaptación A) discontinua y B) continua de los gránulos anaerobios.

Aunque el contenido de metano en el biogás disminuyó, conforme se redujo el TRH, no se suprimió la actividad metanogénica del inóculo y su concentración en el biogás se mantuvo relativamente estable. Esto se puede deber a la protección que les proporcionó la estructura granular, la cual permitió que las arqueas metanogénicas continuaran activas (Taconi et al., 2007, 2008; Zhou y Ren, 2007) bajo las condiciones de operación en las que la variación del sustrato creó un ambiente más favorable para su permanencia.



Como el objetivo era suprimir la actividad metanogénica del inóculo, se decidió evaluar una metodología de adaptación en continuo. El biorreactor se inoculó con gránulos nuevos sin tratamiento ni adaptación previa. En este caso, se adoptaron condiciones de operación más estrictas: TRH de 5.5 h y pH de 4.5. La reducción del pH obedece a que se ha reportado que a un pH de 4.5 las tasas metabólicas de los microorganismos metanogénicos disminuyen, bajo la existencia de microambientes, con la consecuente reducción en la producción de metano (Zhou y Ren, 2007).

La composición de biogás durante la adaptación continua de los gránulos anaerobios se muestra en la Figura 6.2B. Los resultados indicaron que la concentración máxima de metano (68%) en el biogás se presentó en el primer día de operación y su concentración disminuyó gradualmente. A partir del día 14 no se detectó la producción de metano en el biogás. Este resultado indicó que se había suprimido la actividad metanogénica de los gránulos anaerobios. Por lo tanto, se decidió continuar con la aplicación de esta estrategia para evaluar la estabilidad del biorreactor. A partir del día 15 el contenido de hidrógeno en el biogás aumentó y el rendimiento de la producción de hidrógeno fue de 1.8 mol H₂/mol glucosa.

6.3.1.2 DISTRIBUCIÓN DE LOS METABOLITOS PRODUCIDOS

Independientemente del método de adaptación empleado no se detectó la producción de acetona. El balance de electrones-equivalentes se realizó para evaluar la recuperación de DQO considerando los productos líquidos y gaseosos cuantificados. En este caso, el balance de electrones indicó que del 67% al 87% de la DQO de la glucosa alimentada se recuperó en la adaptación en discontinuo y del 3% al 12% de los electrones-equivalentes se emplearon en la producción de hidrógeno. En la adaptación en continuo, el 71% de la DQO de la glucosa alimentada se recuperó y 16% de los electrones se usaron para producir hidrógeno.

Es posible que los electrones restantes estuvieran presentes en el efluente junto con otros productos intermedios y exopolímeros que no fueron cuantificados. Durante la adaptación en discontinuo casi toda la glucosa se consumió a un TRH de 24 h, mientras que en el TRH de 12 y 6 h, el consumo promedio de glucosa fue del 99% y 98.7%, respectivamente. Para el caso de la adaptación en continuo, el consumo promedio de glucosa fue del 97.6%.

La Tabla 6.1 muestra la distribución de los metabolitos solubles durante la adaptación de los gránulos anaerobios en discontinuo y en continuo. La producción de ácido propiónico



disminuyó conforme el TRH se redujo de 24 a 6 h. Esto se atribuyó a la sensibilidad de las bacterias productoras de propionato a las cargas orgánicas asociadas a los TRH cortos empleados (Zhang et al., 2006b). La presencia de ácido propiónico está asociada con el consumo de hidrógeno (De Amorim et al., 2012), que en este caso, se explica por la presencia de microorganismos metanogénicos en el inóculo. Cuando el TRH se redujo de 12 a 6 h, se observó un cambio en la ruta metabólica hacia la producción de ácido acético y ácido butírico, siendo éste último el que predominó durante la operación del reactor a un TRH de 6 h.

A un TRH de 6 h, se incrementó el rendimiento de la producción de hidrógeno pero también se observó una disminución de la producción de ácido acético respecto a la cantidad de ácido butírico. Dado a que los gránulos metanogénicos no se trató previamente a su empleo, es posible que hayan existido tanto bacterias productoras de hidrógeno como microorganismos consumidores de hidrógeno (e. g. arqueas metanogénicas, bacterias acetógenas). Por lo anterior, el incremento del rendimiento se atribuyó a la reducción de la actividad metanogénica del inóculo, mientras que la disminución de la producción de ácido acético posiblemente se debió a la disminución de la actividad acetogénica del inóculo.

Tabla 6.1. Distribución de los metabolitos solubles durante la etapa exploratoria.

TRH (h)	Etanol (mg-DQO/L)	Ácido acético (mg-DQO/L)	Ácido propiónico (mg-DQO/L)	Ácido butírico (mg-DQO/L)	Ácido valérico (mg-DQO/L)
24	174 ± 6	385 ± 19	726 ± 8	380 ± 7	129 ± 6
12	141 ± 12	53 ± 16	69 ± 41	85 ± 51	77 ± 16
6	34 ± 22	49 ± 5	15 ± 4	74 ± 15	44 ± 53
Adaptación continua 5.5	46 ± 40	215 ± 155	178 ± 145	198 ± 97	ND

Valores en la tabla: valor promedio ± desviación estándar.

ND = No Detectado.

Para el caso de la adaptación en continuo, los principales metabolitos solubles producidos fueron los ácidos acético y butírico. En el caso de la producción de etanol, su concentración fue inferior a los otros metabolitos solubles. La producción de ácido propiónico se atribuyó a la



presencia de microorganismos consumidores de hidrógeno. Sin embargo, conforme se fue adaptando a los gránulos anaerobios para producir hidrógeno, la concentración de ácido propiónico se redujo, probablemente, por la sensibilidad de los microorganismos productores de ácido propiónico a las cargas orgánicas asociadas al TRH (Zhang et al., 2006b) y al bajo pH (Wang et al., 2006) aplicados.

Los resultados obtenidos durante la adaptación discontinua indican que la producción de hidrógeno estuvo asociada con la producción de ácido butírico (Mu y Yu, 2006) mientras que la producción de hidrógeno en la adaptación en continuo estuvo relacionada con la producción de ácido acético. Esta diferencia se puede deber a las diferentes condiciones de operación aplicadas en ambas estrategias de adaptación.

6.3.2 OPERACIÓN EN CONTINUO

6.3.2.1 MORFOLOGÍA DE LOS GRÁNULOS

Al comienzo de la adaptación, los gránulos inoculados tenían un diámetro promedio de 2.0 ± 0.2 mm, con un color negro y de consistencia firme (Figura 6.3A). La Figura 6.3B y 6.3C muestran la imagen de los gránulos anaerobios teñidos con los marcadores fluorescentes. Las bacterias se distribuyeron a lo largo del gránulo formando capas (Figura 6.3B), mientras que los β -polisacáridos, los cuales tiene un papel importante en la adhesión de célula a célula así como en la formación de los gránulos (Fletcher y Floodgate, 1973; Schmidt y Ahring, 1994), se distribuyeron principalmente a lo largo de la capa exterior y en el núcleo central del gránulo (Figura 6.3C).

Esta distribución de los β -polisacáridos (De Beer et al., 1996) y de las células (Fang et al., 1994) es común en los gránulos anaerobios. La capa externa de los gránulos está formada por microorganismos con formas de cocos, bacilos, microorganismos filamentosos y microorganismos similares a los *Methanococcales* (McLeod et al., 1990). La zona central está formada por diferentes bacterias similares a las del género *Clostridium* y a los microorganismos consumidores de hidrógeno, mientras que el núcleo está formado por microorganismos similares a la *Methanothrix* (McLeod et al., 1990; Fang et al., 1994).

Después de 66 días de operación continua, los gránulos mostraron un color café claro con una estructura porosa (McLeod et al., 1990) y un diámetro promedio de 1.4 ± 0.5 mm (Figura 6.3D). Fang et al. (2002a, 2002b) sugirieron que las variaciones de color se deben a la actividad



sulfidogénica del inóculo. A un pH mayor a 6.0, el sulfato se reduce a sulfuro por las bacterias sulfato reductoras que reaccionan con los metales para formar precipitados de color negro. A un pH menor a 5.5, la actividad sulfato reductora se suprime, y por lo tanto, el color oscuro desaparece (Fang et al., 2002a, 2002b).

Es posible que los microorganismos tales como la *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium acetobutyricum*, *Clostridium celerecrescens* y *Sporolactobacillus racemicus* del grupo de los *Bacillus/Staphylococcus* estuvieran presentes en el sistema debido a que su presencia se ha reportado en los sistemas con gránulos productores de hidrógeno.

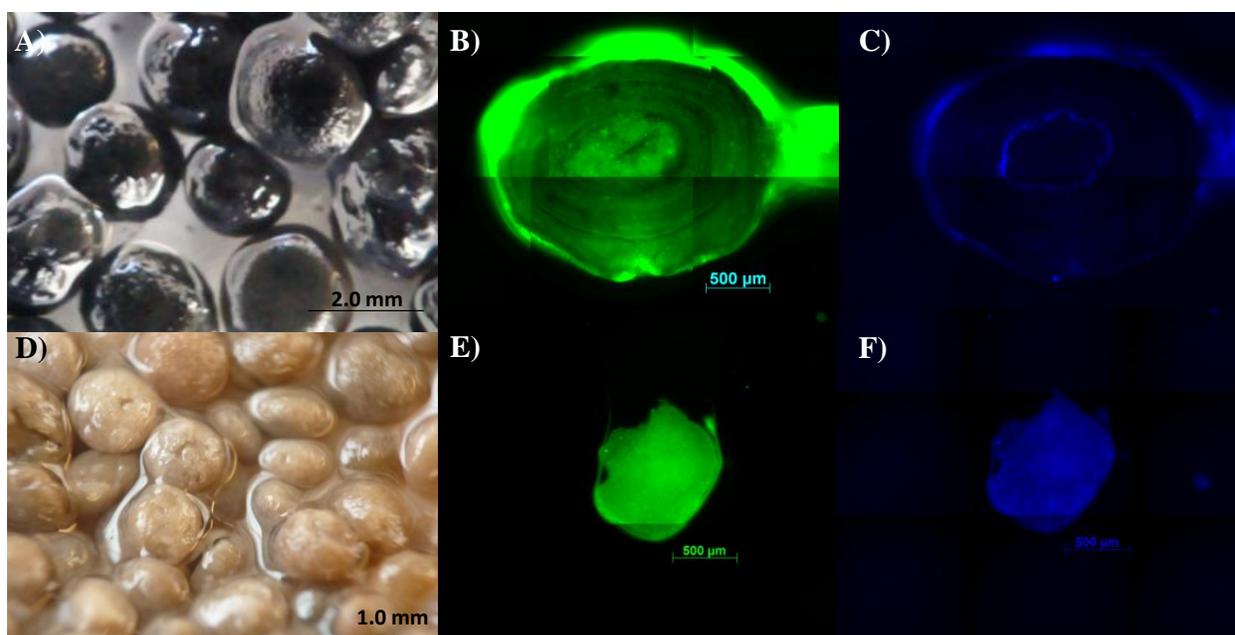


Figura 6.3. Gránulos teñidos. Inóculo: A) gránulos anaerobios inoculados, B) células y C) β -polisacáridos. Gránulos productores de hidrógeno: D) gránulos anaerobios adaptados para producir hidrógeno, E) células y F) β -polisacáridos.

La Figura 6.3E y 6.3F muestran los gránulos teñidos después de 50 días de operación continua. Las células se distribuyeron a lo largo del gránulo sin formar capas y los β -polisacáridos se distribuyeron homogéneamente a lo largo del gránulo. Esto puede explicarse considerando que la integridad de la estructura de los gránulos productores de hidrógeno puede ser más dependiente de la distribución de los polisacáridos como se ha sugerido por otros investigadores (McLeod et al., 1990; Fang et al., 2002b). Respecto a la comunidad microbiológica, es probable que los microorganismos consumidores de hidrógeno, en estado de latencia, hayan quedado confinados en una parte muy pequeña del núcleo del gránulo. Debido



a la sensibilidad de las bacterias productoras de hidrógeno a la presencia de oxígeno, Es probable que tanto los microorganismos anaerobios facultativos como las bacterias productoras de hidrógeno se distribuyeron de manera uniforme a lo largo del gránulo, debido a la presencia de múltiples cavidades en el interior del gránulo (Fang et al., 2002b; Zhang et al., 2008), las cuales facilitan el flujo del sustrato y de los nutrientes hacia el interior del gránulo.

6.3.2.2 ESTABILIDAD DEL BIORREACTOR

Después del período de adaptación de los gránulos anaerobios (del día 1 al 17), el biorreactor se operó durante otros 49 días para evaluar la estabilidad de la producción de hidrógeno y la supresión efectiva de los microorganismos metanogénicos. Desde el día 18 hasta el 66, el contenido de hidrógeno en el biogás aumentó y varió del 66% al 77%. Este rango de valores de bio-hidrógeno es similar a los reportados para los inóculos tratados térmicamente (Kim et al., 2008; Won y Lau, 2011; Azbar et al., 2009). La evolución de la producción de bio-hidrógeno se muestra en la Figura 6.4.

Se observó que bajo las condiciones de operación aplicadas se suprimió la actividad metanogénica del inóculo. La composición del biogás y la producción de hidrógeno se mantuvieron estables. La TPH y el Y_{H_2} fueron de 72 ± 5 mL- H_2 L⁻¹ h⁻¹ y 2.6 ± 0.2 mol H_2 /mol glucosa, respectivamente. Es posible que la combinación de los parámetros de operación adoptados junto con la estructura porosa de los gránulos, la cual es adecuada para la transferencia de masa de los nutrientes y el biogás producido (Hu y Chen, 2008), dio lugar a una biomasa más activa.

El rendimiento que se obtuvo en este estudio es comparable a los obtenidos cuando se utilizaron otros métodos de tratamiento del inóculo. Kotsopoulos et al. (2006) utilizando gránulos anaerobios, a temperaturas hiper-termofílicas con la ayuda de 2-bromoetanosulfonato de sodio, obtuvieron un Y_{H_2} en el rango de 1.14 a 1.87 mol H_2 /mol hexosa sin llegar a suprimir la actividad metanogénica. Hu y Chen (2008), utilizando gránulos tratados con cloroformo, obtuvieron un Y_{H_2} de 1.34 mol H_2 /mol glucosa. Mu y Yu (2006) formaron gránulos productores de hidrógeno y obtuvieron un Y_{H_2} de 2.88 ± 0.2 mol H_2 /mol sacarosa, mientras que Fang et al. (2002b) obtuvieron un Y_{H_2} de 2.2 mol H_2 /mol sacarosa.

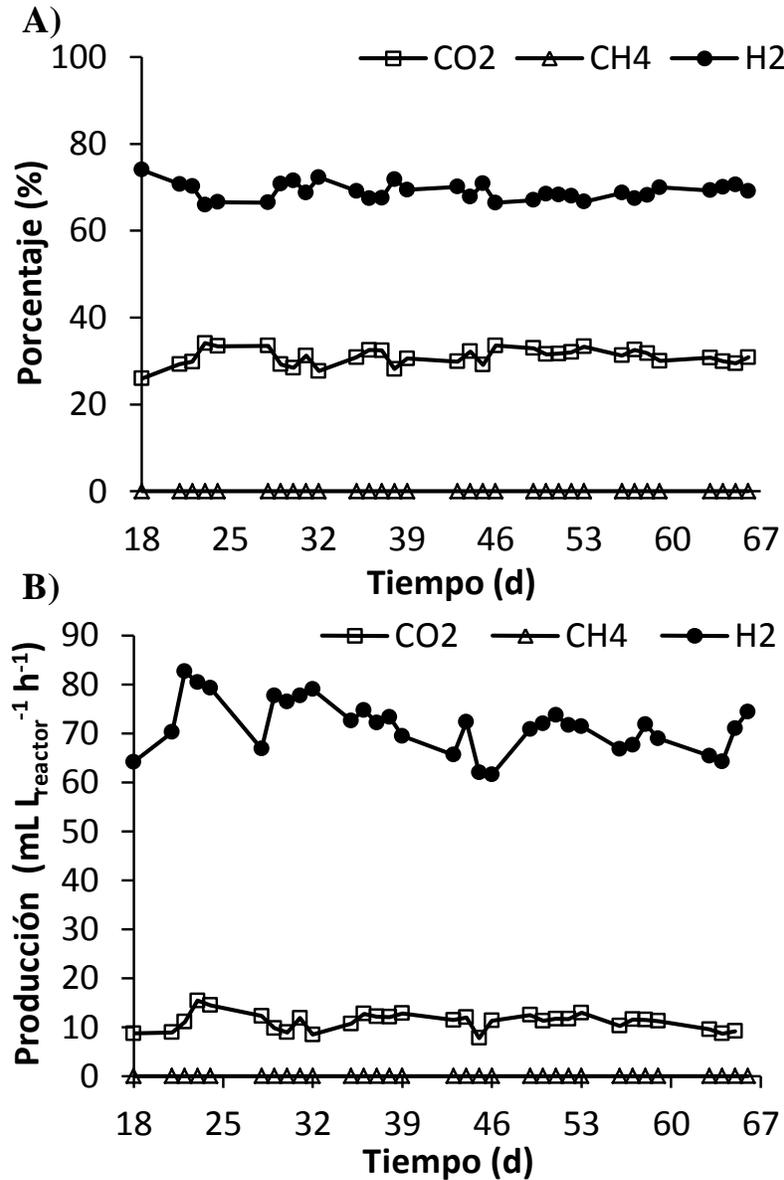


Figura 6.4. Evolución del biogás producido.

Estudios previos han mostrado que la supresión completa de los microorganismos metanogénicos es difícil de lograr con sustratos ricos en azúcares. Por ejemplo, la producción de bio-hidrógeno a partir de residuos del molido del olivo, utilizando biomasa inmovilizada, generó inevitablemente la producción de bio-metano (Scoma et al., 2013). Este también es el caso de las vinazas de tequila (Buitrón y Carvajal, 2010), del hollejo del tomate (Sarada y Joseph, 1996), los residuos de la papa (Kryvoruchko et al., 2009) y se puede evitar



eventualmente sólo con sustratos ampliamente conocidos por ser recalcitrantes para la producción de bio-metano, tales como el suero del queso (Dinuccio et al., 2010).

Se ha dedicado un esfuerzo considerable para el acondicionamiento de la biomasa anaerobia para la producción de hidrógeno aplicando tratamiento térmico (Abreu et al., 2011; Zhou y Ren, 2007) o sustancias químicas (Ye et al., 1999). Sin embargo, desde un punto de vista práctico estos pre-tratamientos son difíciles de implementar. Por otro lado, también se ha estudiado la formación de gránulos productores de hidrógeno, pero se requieren largos periodos de tiempo para su obtención (Lee et al., 2004; Mu y Yu, 2006).

En este trabajo, se presenta una metodología más práctica para la adaptación de los gránulos anaerobios. Esta metodología evita los inconvenientes asociados con el uso de tratamientos térmicos o químicos del inóculo para la producción de hidrógeno haciéndolo adecuado para su aplicación práctica. Se demostró que la actividad metanogénica de los gránulos anaerobios se suprimió completamente, cuando la presión de selección se realiza mediante la operación continua del biorreactor con un TRH corto y un pH bajo. Incluso, se observó que la producción de bio-hidrógeno se mantuvo estable bajo las condiciones de operación empleadas.

6.3.2.3 DISTRIBUCIÓN DE LOS METABOLITOS SOLUBLES

La distribución de los metabolitos solubles durante la adaptación continua del inóculo (del día 18 al 66) se muestra en la Figura 6.5.

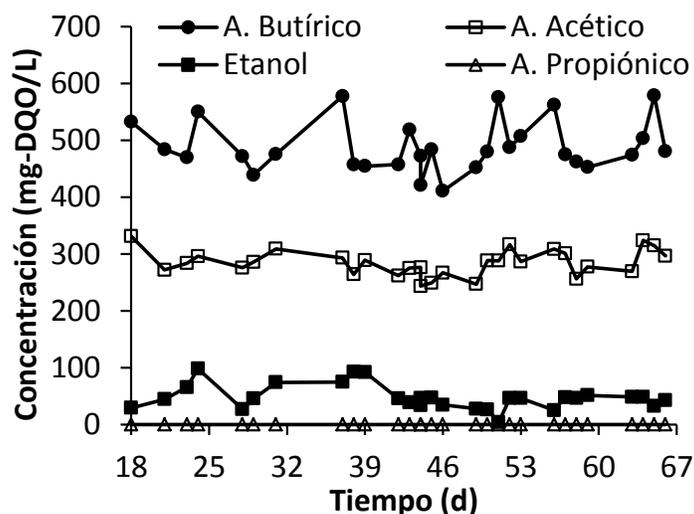


Figura 6.5. Distribución de los metabolitos solubles.



El ácido butírico fue el principal metabolito soluble producido seguido por el ácido acético. Durante la adaptación continua de los gránulos anaerobios se observó un cambio en la ruta metabólica, la cual paso de una fermentación tipo ácido acético a una del tipo ácido butírico. Esto sugiere que la producción de hidrógeno se asoció con la producción de ácido butírico (Mu et al., 2006a). Por lo tanto, es posible que las condiciones operacionales favorecieran el desarrollo de microorganismos tales como la *Clostridium* (Oren, 2010; Jungermann et al, 1973) ya que éstos pueden producir ácido butírico como producto primario de la fermentación de la glucosa junto con el ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono.

6.3.3 ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD MICROBIANA

El análisis de la comunidad microbiana reveló diferencias en el tipo de microorganismos presentes entre los dos sistemas a pesar de que se empleó el mismo tipo de inóculo (Figura 6.6 y Tabla 6.2), lo cual se puede deber a las diferencias en la presión de selección empleadas en cada uno de los biorreactores.

En ambos sistemas se encontró la presencia de microorganismos del género *Clostridium* (i. e. *Clostridiales sp.* en el sistema operado de manera discontinua y *Clostridium difficile* en el sistema operado de manera continua), los cuales son los principales responsables de la producción de hidrógeno (Reith et al., 2003; Wang et al., 2011). Los microorganismos dominantes del sistema operado de manera continua pertenecen al género *Escherichia* mientras que los microorganismos dominantes en el sistema operado de manera discontinua pertenecen al orden filogenético de los *Clostridiales*. La presencia de *Clostridium difficile*, *Clostridiales sp.* y *Escherichia coli* se ha reportado en los sistemas productores de hidrógeno (Jame et al., 2011; Das y Veziroglu, 2001).

La presencia de los microorganismos no productores de hidrógeno se debe a que ya estaban presentes en el inóculo y, que debido a la operación, encontraron condiciones adecuadas para su permanencia en el sistema. Sin embargo, debido al origen del inóculo y a que no se esterilizó el sustrato resulta poco factible que no sólo se hubiera detectado la presencia de microorganismos productores de hidrógeno, aún más, es probable que su presencia en el sistema haya contribuido a generar las condiciones necesarias (e. g. anaerobiosis estricta debido al consumo de oxígeno en el sistema) para permitir la producción de hidrógeno.

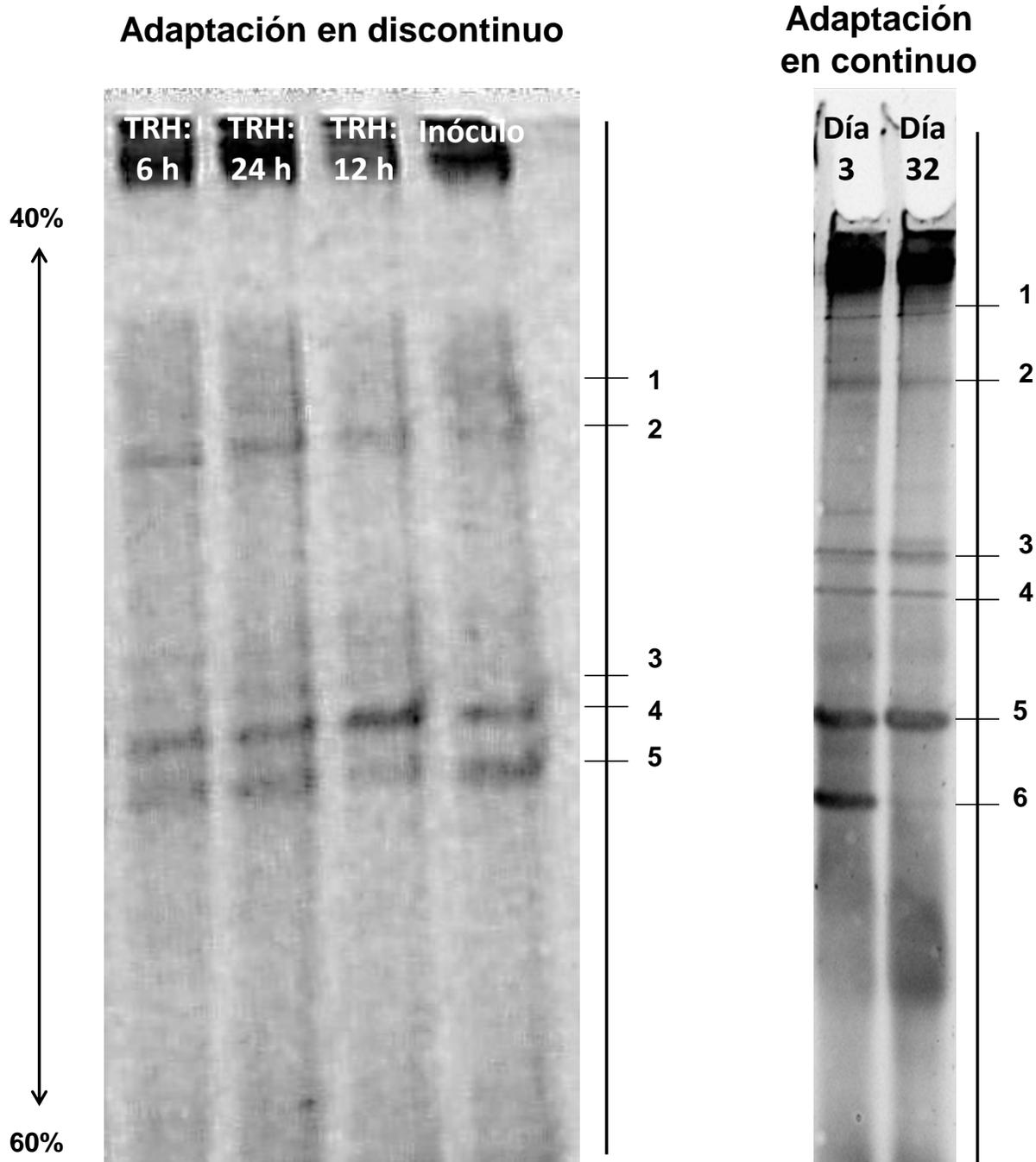


Figura 6.6. Perfiles de la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) de los gránulos durante su adaptación para la producción de hidrógeno.



Tabla 6.2. Identificación de las bandas obtenidas en el análisis de la comunidad microbiana.

No. de Banda del DGGE	Afiliación	% Similitud	Número de acceso GenBank
Biorreactor operado de manera discontinua			
1	<i>Ralstonia solanacearum</i>	88	NC_017575.1
2	<i>Desulfobacca acetoxidans</i>	99	NC_015388.1
3	<i>Burkholderia</i> sp.	97	NC_014539.1
4	<i>Clostridiales</i> sp.	99	FP 929062.1
5	<i>Desulfobulbus propionicus</i>	92	NC_014972.1
Biorreactor operado de manera continua			
1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	95	NC_017150.1
2	<i>Ralstonia solanacearum</i>	86	NC_017575.1
3	<i>Clostridium difficile</i>	91	NC_017179.1
4	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	96	NC_019395.1
5	<i>Escherichia coli</i>	97	NC_011993.1
6	<i>Streptomyces davawensis</i>	88	HE971709.1

En el caso de la adaptación del inóculo mediante la operación discontinua del reactor, se encontró la presencia de las bacterias *Desulfobacca acetoxidans*, *Desulfobulbus propionicus* y *Burkholderia* las cuales son Protobacterias no productoras de hidrógeno (Madigan et al., 2009). La bacteria *Desulfobacca acetoxidans* crece a un pH en el rango de 7.5 a 7.7 y utiliza al acetato como el único donador de electrones y fuente de carbono y lo oxida a dióxido de carbono (Garrity, 2005). La bacteria *Desulfobulbus propionicus* es una bacteria Gram-negativa que no forma esporas y crece a un pH entre 6.0 y 8.6 con un pH óptimo para su crecimiento entre 7.1 y 7.5 (Widdel y Pfennig, 1982). Esta bacteria utiliza al propionato como donador de electrones y produce acetato y dióxido de carbono (Madigan et al., 2009). Aunque las bacterias *D. acetoxidans* y *D. propionicus* estuvieron presentes en toda la etapa de adaptación, su presencia tendió a disminuir, tal como se puede apreciar en la reducción de la intensidad de las bandas correspondientes. Lo cual se pudo deber a las condiciones ácidas predominantes en el reactor.



La bacteria *Ralstonia solanacearum* (anteriormente llamada *Pseudomonas solanacearum*), la cual es un microorganismos oxidante del hidrógeno que pertenece al grupo filogenético *Betaproteobacteria* (Madigan et al., 2009), se encontró tanto en el sistema operado de manera discontinua como en el operado de manera continua. Esta bacteria contiene una o más enzimas hidrogenasas que funcionan uniendo el hidrógeno (H_2) y lo utilizan para producir ATP o bien, por su pode reductivo, para el crecimiento autotrófico (Madigan et al., 2009). Aunque se encontró presente en ambos reactores, su presencia fue disminuyendo debido a que estos microorganismos crecen a pH neutro (Madigan et al., 2009).

La bacteria *Propionibacterium acidipropionici*, que se encontró en el sistema operado de manera continua, es una bacteria del ácido propiónico que fermenta el ácido láctico, los carbohidratos y los polyhidoxil alcoholes y produce ácido propiónico, ácido acético y dióxido de carbono (Madigan et al., 2009). La bacteria *Streptomyces davawensis*, es una actinobacteria filamentosa Gram-positiva, que produce antibiótico y crece en medios alcalinos (Madigan et al., 2009), por lo que, al emplear un pH ácido en el sistema, su presencia tendió a disminuir.

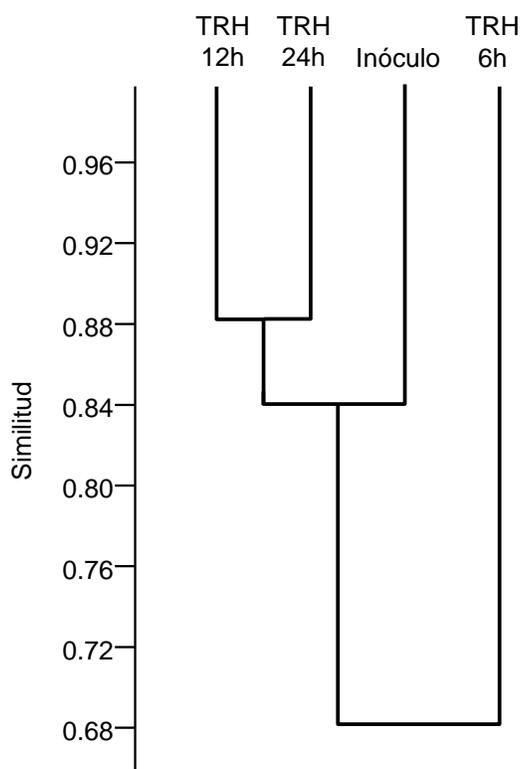


Figura 6.7. Similitud de las comunidades microbianas en el biorreactor operado de manera discontinua secuencial a diferentes TRH.



La similitud entre las bandas de DGGE se evaluó mediante el índice de Jaccard (Figura 6.7). Este análisis reveló el aumento de las diferencias en la comunidad microbiana. Un índice de similitud de 1.0 indica que hay comunidades similares. Se observó un índice de Jaccard de 0.90 entre el inóculo y la biomasa obtenida a un TRH de 12 y 24 h. Sin embargo, la similitud entre el inóculo y la biomasa obtenida a un TRH de 6 h es de solo 0.68. El índice de diversidad de Shannon, en el reactor discontinuos disminuyó de 2.197 (inóculo) a 1.946 (biomasa obtenida a un TRH de 6 h). Para el caso del reactor operado en continuo, la similitud entre las biomasas en el día 3 y el día 32 fue de 0.76, y el índice de diversidad disminuyó de 1.946 a 1.792. Estos resultados demuestran que el cambio en el modo de operación no sólo redujo la diversidad, sino también la composición de la comunidad microbiana.

6.4 CONCLUSIONES PARCIALES

Se evaluó una metodología para la adaptación de los gránulos anaerobios que permitió la supresión de su actividad metanogénica y favoreció la producción de hidrógeno, encontrando que los gránulos anaerobios fueron capaces de producir hidrógeno debido a la aplicación de la presión de selección dada, principalmente, por el pH bajo. Los resultados preliminares en la operación discontinua indicaron que la actividad de las bacterias metanogénicas no se suprimió totalmente, lo cual se pudo deber a la adaptación de las arqueas metanogénicas a las condiciones de pH empleado (pH: 5.5). Sin embargo, la adaptación continua suprimió exitosamente la actividad metanogénica de los gránulos inoculados, observándose una producción estable de hidrógeno durante 66 días, lo cual se debió al uso de un pH y un TRH menores. Se observó una distribución homogénea de las células y β -polisacáridos, los cuales tienen un papel importante en la adhesión de las células, en los gránulos adaptados. El alto rendimiento obtenido y la distribución uniforme de las células sugieren que la adaptación continua generó una biomasa más activa debido a la mejor transferencia de masa en el proceso. A pesar de que se empleó el mismo tipo de inóculo en ambos tipos de operación del biorreactor, la comunidad bacteriana establecida en ambos sistemas fue diferente lo cual se debió a que en la operación en continuo se utilizó una presión de selección más fuerte (pH: 4.5 y TRH: 5.5 h). Las diferentes estrategias de adaptación empleadas no sólo redujeron la diversidad sino también la composición de la comunidad microbiana. Se encontró la presencia de bacterias del tipo *Clostridium* en la comunidad bacteriana de ambos sistemas.



CAPÍTULO 7.
INFLUENCIA DE LA TASA DE CARGA
ORGÁNICA EN LA PRODUCCIÓN
DE BIO-HIDRÓGENO

Publicaciones derivadas de este capítulo

Hernández-Mendoza CE, Buitrón G. Effect of the organic loading rate on hydrogen production in a granular sludge membrane bioreactor. *Sometido*, Bioresource Technology.

Hernández-Mendoza CE, Buitrón G (2012). Bio-hydrogen production at different organic loading rates in a membrane bioreactor inoculated with granular sludge. IWA World Congress on Water, Climate and Energy. May, 13-18. Dublín, Irlanda.

Hernández-Mendoza CE, Buitrón, G. (2013). Enhancing the hydrogen production through the organic loading rate and the hydraulic retention time. 13th World Congress on Anaerobic Digestion. June, 25-28. Santiago de Compostela, España.





7.1 INTRODUCCIÓN

La tasa de carga orgánica (TCO) es un parámetro importante en la operación de los biorreactores y su relación con la producción de bio-hidrógeno no es clara (Kraemer y Bagley, 2007). Para optimizar los sistemas de producción de hidrógeno se debe definir un rango de TCO que el sistema pueda manejar correctamente o una TCO óptima que incremente la producción de hidrógeno (Kraemer y Bagley, 2007; Hafez et al., 2010).

La producción de hidrógeno se ha estudiado ampliamente en biorreactores CSTR debido a que sus características permiten un buen mezclado con lo cual se mejora la eficiencia de transferencia de masa. Sin embargo, la aplicación de altas TCO en ésta configuración del biorreactor resulta en la pérdida de estabilidad y baja producción de hidrógeno (Guo et al., 2008b).

La granulación es un proceso complejo que implica muchas interacciones fisicoquímicas y microbianas. Los gránulos pueden resistir el lavado del biorreactor debido a sus características físicas (i. e. agregados densos) (Seghezzi et al., 1998). Los gránulos anaerobios se forman principalmente en los biorreactores UASB, cuya principal ventaja es el control del lavado de la biomasa y su capacidad para trabajar a altas TCO (Lettinga et al., 1980).

Cuando en los procesos anaerobios de alta tasa no se puede lograr la retención de la biomasa, ya sea por la formación de gránulos o por la adhesión de la biomasa a un material de soporte, ésta se puede retener mediante el uso de membranas (Liao et al., 2006). Los biorreactores con membranas son una tecnología bien conocida para mejorar el tratamiento de las aguas residuales. Sin embargo, Shen et al. (2009) han señalado que los estudios con biorreactores con membranas para la producción de hidrógeno son escasos.

La combinación del uso de lodo granular y membranas se ha empleado para el tratamiento, en condiciones anaerobias de aguas residuales domésticas (Chu et al., 2005a) y para el tratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios (Bohdziewicz, 2008). En el caso de la producción de bio-hidrógeno, las membranas se han utilizado tanto en su configuración externa (Lee et al., 2007) como sumergida (Shen et al., 2009). No obstante, hasta el momento, no se ha reportado el empleo de combinado de lodo granular y membranas para producir bio-hidrógeno.



El objetivo de este capítulo fue evaluar la influencia de la TCO en un biorreactor con membranas sumergidas inoculado con lodo anaerobio granular, a fin de obtener la condición que promueva una mayor producción de hidrógeno.

7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos empleados en esta parte de la experimentación son los descritos en el Capítulo 3.

El inóculo se aclimató previamente en un biorreactor UASB bajo un régimen de flujo continuo (TRH: 5.5 h, pH: 4.5 y TCO: 5.0 kg-glucosa $m^{-3} d^{-1}$) sin utilizar el módulo de membranas. Se consideró que los gránulos anaerobios estaban aclimatados cuando el contenido de hidrógeno en el biogás y la tasa de producción presentaron una variación máxima de $\pm 10\%$.

Después de aclimatar a la biomasa para la producción de hidrógeno durante 66 días, se instaló el módulo de membranas de ultrafiltración (fibras huecas, PVDF, 250 kDa, 0.032 m^2 , diámetro de poro 0.1 μm , MEMOS GmbH) en el interior del biorreactor. Para evaluar el efecto de la TCO, se incrementó gradualmente la concentración de la glucosa en el influente para obtener un rango de TCO de 5 a 60 kg-glucosa $m^{-3} d^{-1}$. Antes de cada incremento de la TCO, la membrana se lavó químicamente para restaurar su desempeño. El biorreactor se operó por un periodo equivalente de al menos 30 veces el TRH aplicado para permitir que el sistema alcanzara el estado estacionario. El análisis de datos se realizó utilizando los valores promedio en el estado estacionario.

7.3 RESULTADOS

7.3.1 EFECTO SOBRE LOS GRÁNULOS MICROBIANOS

Al final del periodo de aclimatación el diámetro de los gránulos se redujo de 2.0 ± 0.2 a 1.4 ± 0.5 mm. El color de los gránulos cambió a un color café claro debido a la supresión de la actividad sulfidogénica de los microorganismos contenidos en los gránulos (Fang et al., 2002a).

Los células contenidas en los gránulos productores de hidrógeno (GPH) se distribuyeron homogéneamente sin formar capas y presentaron muchas cavidades en su superficie (Mu y Yu, 2006; Fang et al., 2002b). Al parecer los GPH son menos porosos que los flóculos (Mu y Yu,



2006) y tienden a producir más polímeros extracelulares (Mu y Yu, 2006; Fang et al., 2002b). Predominantemente, los microorganismos presentes en los GPH presentaron forma de bacilos. Es posible que los GPH estuvieran formados por microorganismos tales como la *C. pasteurianum*, *C. acetobutyricum* y *C. celerecrescens*, debido a que su presencia se ha reportado en aquellos sistemas en los que se ha empleado lodo granular para la producción de hidrógeno (Fang et al., 2002b).

El diámetro de los gránulos aumentó de 1.4 ± 0.5 mm a 1.8 ± 0.4 mm, conforme la TCO se incrementó de 5 a 30 kg-glucosa $m^{-3} d^{-1}$, pero cuando se incrementó la TCO a 60 kg-glucosa $m^{-3} d^{-1}$ el diámetro de los gránulos se redujo a 1.6 ± 0.3 mm (Figura 7.1). Sin embargo, a partir del análisis estadístico (t-Student), se determinó que las variaciones del diámetro de los gránulos durante el incremento de la TCO no fueron significativas. El tamaño de los gránulos obtenidos están dentro del rango de 0.9 a 2.5 mm reportado por Fang et al. (2002b).

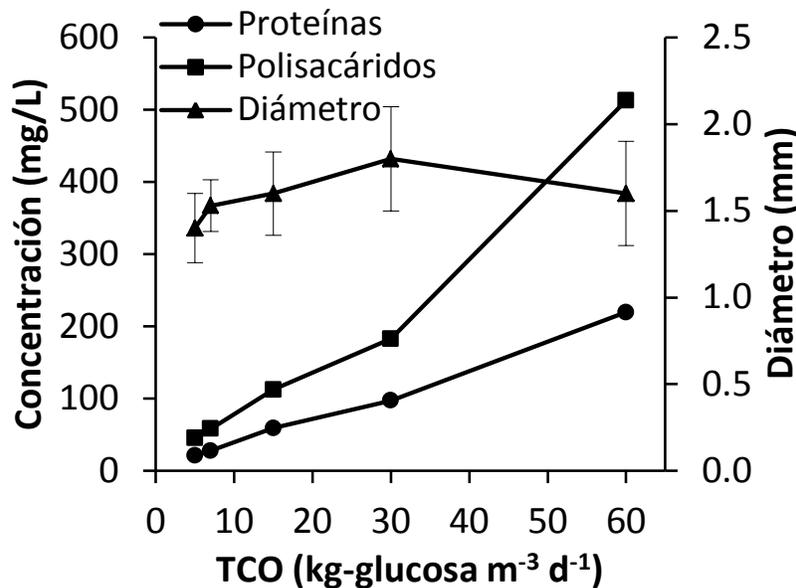


Figura 7.1. Efecto de la TCO en el diámetro de los gránulos y en la producción de EPS.

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS por sus siglas en inglés) son compuestos de origen microbiano (e. g. polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos) que se liberan en la solución durante la utilización del sustrato y el decaimiento de la biomasa (Namkung y Rittmann, 1986). La producción de EPS tiene un papel importante tanto en la adherencia de célula a célula como en la formación de los gránulos (Schmidt y Ahring, 1994). Los principales



componentes de los EPS producidos por los GPH son las proteínas y los polisacáridos (Mu y Yu, 2006).

Se encontró que la producción de EPS (Figura 7.1), proteínas y polisacáridos, aumentó gradualmente de 67 a 280 mg/L dentro del rango de TCO de 5 a 30 kg-glucosa $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$ y aumentó 2.6 veces (730 mg/L) cuando la TCO se incrementó 2 veces (de 30 a 60 kg-glucosa $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$). El aumento en la producción de EPS se puede atribuir a la acumulación del carbono orgánico que no pueden asimilar los microorganismos y se transfiere a las sustancias intracelulares para su almacenamiento o para la producción de biopolímeros extracelulares, tal como se ha observado para los procesos que se han trabajado a altas cargas de carbono (Zhang et al., 2007c). Asimismo, es posible que el incremento de la cantidad de EPS fuera una consecuencia de la pérdida de la permeabilidad de la membrana conforme se incrementó la TCO.

Independientemente de la TCO probada, la concentración de polisacáridos fue mayor que el contenido de proteínas. La relación proteínas/polisacáridos (PN/PS) varió de 0.47 a 0.53 a una carga orgánica de hasta 30 kg-glucosa $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$ y disminuyó a 0.43 cuando la carga orgánica se incrementó hasta 60 kg-glucosa $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$. Los valores de la relación PN/PS obtenido están en el rango de 0.2 a 0.6 reportado por Fang et al. (2002b) y por Mu y Yu (2006).

7.3.2 DESEMPEÑO DEL BIORREACTOR

Como se puede apreciar en la Figura 7.2A, la producción de bio-hidrógeno aumentó conforme se incrementó la TCO de 5 a 30 kg-glucosa $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$. A una TCO mayor (60 kg-glucosa $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$) la producción de bio-hidrógeno disminuyó. El contenido de hidrógeno en el biogás prácticamente no se vio afectada por el aumento de la TCO, ya que su concentración disminuyó del 73% al 70% conforme la TCO se aumentó de 5 a 30 kg-glucosa $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$ (Figura 7.2A). Sin embargo, el contenido de hidrógeno se redujo a 64% cuando la TCO se incrementó hasta 60 kg-glucosa $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$. El alto contenido de hidrógeno en el biogás obtenido en este estudio concuerda con lo reportado por otros investigadores (Wong y Lau, 2011; Azbar et al, 2009).

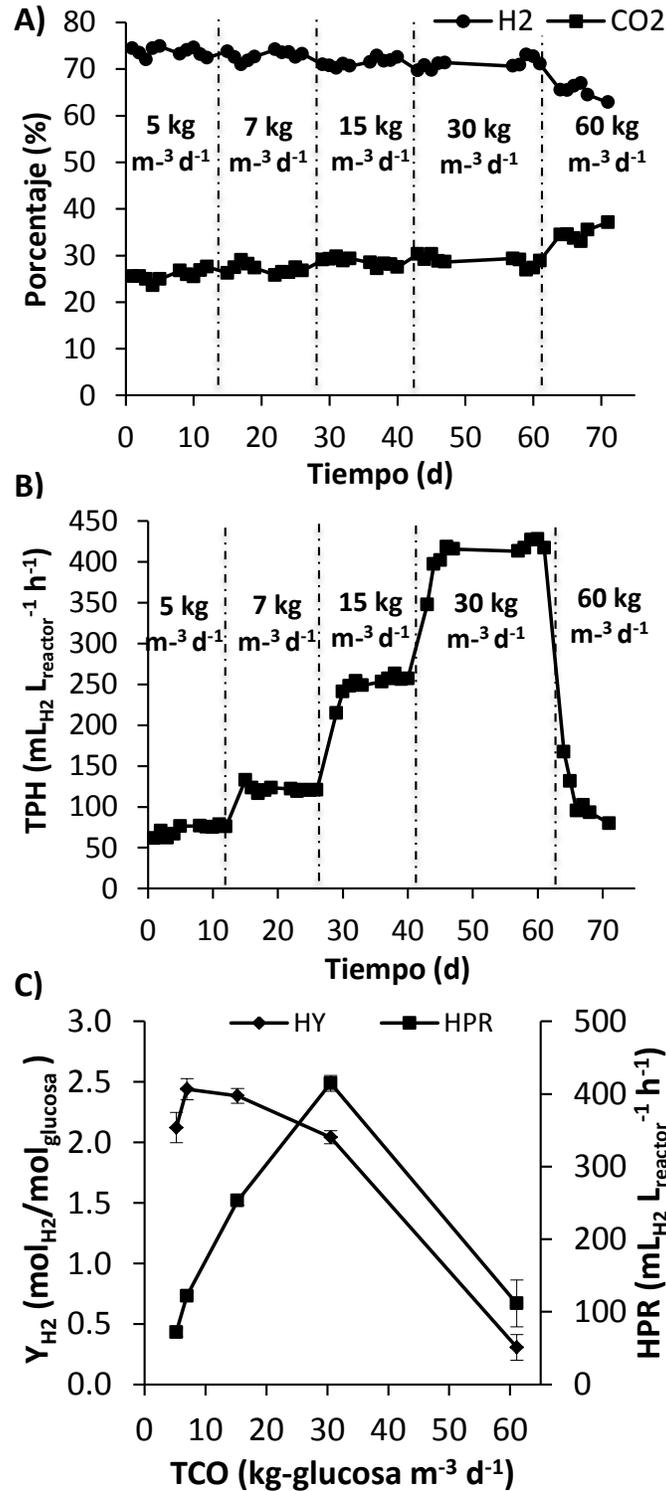


Figura 7.2. Evolución de la producción de bio-hidrógeno a diferentes TCO. A) Composición del biogás, B) tasa de producción y C) rendimiento de la producción de bio-hidrógeno.



La TPH y el Y_{H_2} fueron sensibles al incremento de la TCO. La producción de bio-hidrógeno se mantuvo estable a niveles de TCO dentro del rango de 5 a 30 kg-glucosa $m^{-3} d^{-1}$ (Figura 7.2). Conforme la TCO se incrementó 6 veces la TPH aumentó 5.4 veces, pero un incremento mayor de la TCO (60 kg-glucosa $m^{-3} d^{-1}$) redujo 3.5 veces la TPH (Figura 7.2B). El Y_{H_2} máximo (2.4 ± 0.1 mol H_2 /mol glucosa) se obtuvo a una TCO de 7 kg-glucosa $m^{-3} d^{-1}$, mientras que a una TCO de 30 kg-glucosa $m^{-3} d^{-1}$ el Y_{H_2} fue de 2.0 ± 0.1 mol H_2 /mol glucosa (Figura 7.2C).

Los resultados mostraron que el mayor Y_{H_2} (2.4 ± 0.1 mol H_2 /mol glucosa) se obtuvo a una TCO de 7 kg-glucosa $m^{-3} d^{-1}$, mientras que el Y_{H_2} menor (0.3 ± 0.1 mol H_2 /mol glucosa) se obtuvo a una TCO de 60 kg-glucosa $m^{-3} d^{-1}$ (Figura 7.2C). Estos rendimientos están dentro de los reportados en la literatura (0.3 a 3.1 mol H_2 /mol glucosa) por Wang y Wan (2009). Se ha observado que la variación del Y_{H_2} con la TCO está relacionada con la diversidad de la población microbiana presente en el biorreactor. A una TCO baja la población es más diversa y variable que a una TCO alta (Luo et al., 2008).

La Figura 7.2C muestra que la TPH alcanzó un valor máximo de 428 mL- H_2 $L^{-1} h^{-1}$ a una TCO de 30 kg-glucosa $m^{-3} d^{-1}$. La TPH se redujo significativamente a una TCO mayor. La existencia de una condición óptima ya se ha observado previamente (De Amorim et al., 2012; Shen et al., 2009). La eficiencia de la degradación de la glucosa se mantuvo en más del 95% a TCO de hasta 30 kg-glucosa $m^{-3} d^{-1}$ y alcanzó una eficiencia mínima (80%, promedio) cuando la TCO se incrementó a 60 kg-glucosa $m^{-3} d^{-1}$, lo cual indicó que el biorreactor se había sobrecargado respecto a la utilización de la glucosa.

7.3.3 METABOLITOS SOLUBLES PRODUCIDOS

No se detectó la producción de ácido propiónico durante todo el experimento debido, probablemente, a la inhibición de los microorganismos productores de ácido propiónico por las cargas orgánicas asociadas al corto TRH (Zhang et al., 2006b) y el bajo pH (Wang et al., 2006a) aplicados. De Amorim et al. (2012) también observaron la ausencia de producción de ácido propiónico, atribuyéndolo a la combinación del TRH y la carga orgánica empleada. La producción total de ácido acético y butírico se intensificó a medida que la TCO se incrementó de 5 a 30 kg-glucosa $m^{-3} d^{-1}$ alcanzando una concentración máxima de 0.7 mol de ácido acético/mol de glucosa y 0.6 mol de ácido butírico/mol de glucosa (Figura 7.3A y 7.3B).

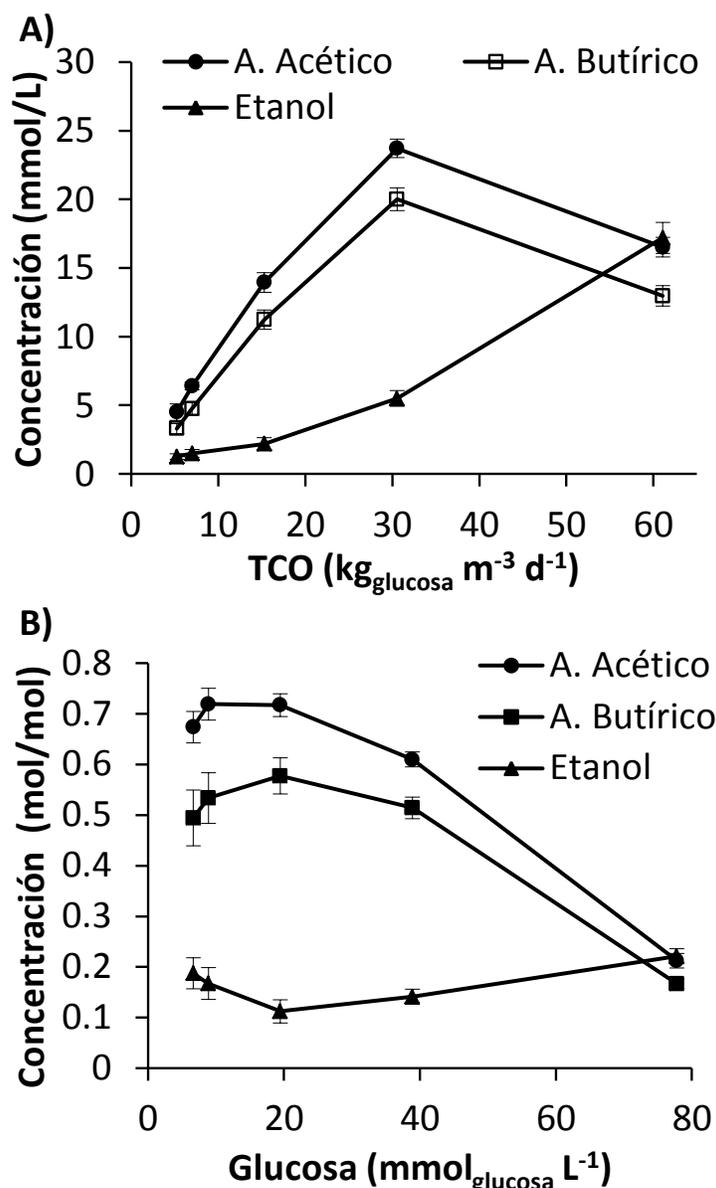


Figura 7.3. Metabolitos solubles producidos a diferentes TCO. A) Distribución y B) producción por mol de glucosa alimentada.

Los ácidos butírico y acético fueron los principales intermediarios producidos hasta una TCO de 30 kg-glucosa m⁻³ d⁻¹, pero cuando se sobrecargó el biorreactor la concentración de etanol aumentó considerablemente. Estos resultados sugieren la presencia de microorganismos productores de hidrógeno tales como *C. acetobutyricum*, *C. butyricum*, *C. pasteurianum* y *Klebsiella pneumoniae*, los cuales son capaces de producir ácidos butírico y acético (Hafez et al, 2010; Madigan et al, 2009). A una TCO alta las poblaciones microbianas cambiaron a una



mezcla de poblaciones no productoras de hidrógeno (*Lactococcus* y *Pseudomonas*) con algunos microorganismos productores de hidrógeno (Hafez et al., 2010).

Se observó la reducción de los AGV producidos conforme se incrementó la TCO de 15 a 60 kg-glucosa m⁻³ d⁻¹. La disminución de la producción de ácidos por mol de glucosa (Figura 7.3B) se puede deber a una reducción de la transferencia de masa en los gránulos (De Amorim, 2012; Kyazze et al, 2006). Donland y Costerton (2002) señalaron, que los EPS pueden funcionar como una barrera difusional ya sea mediante la alteración de la velocidad de transporte al interior de la biopelícula o alterando la reacción con el material matriz.

La disminución del Y_{H₂} y consumo del sustrato se puede deber a la acumulación de AGV en su forma no disociada (Van Ginkel y Logan, 2005a). La forma no disociada de los AGV producidos durante la fermentación es un factor importante que promueve el cambio de la producción de hidrógeno a la producción de disolventes. Dicho cambio se ha observado en el intervalo de 2 a 45 mM (Van Ginkel y Logan, 2005a; Grupe y Gottschalk, 1992; Terracciano y Kashket, 1986; Gottwald y Gottschalk, 1985).

El descenso en la producción de bio-hidrógeno se atribuyó a una concentración total de ácidos no disociados de 29 mM, siendo la concentración no disociada de ácido butírico la que tuvo un efecto mayor. Esto concuerda con otros investigadores que han indicado que la forma no disociada de los AGV, principalmente el ácido butírico, tiene efectos inhibitorios sobre el proceso de producción de bio-hidrógeno (Van Ginkel y Logan, 2005a). Lo anterior se debe a que los ácidos no disociados pueden permearse libremente a través de la membrana de la célula lo que provoca su acumulación en el interior de la misma, reduce su pH interno y promueve un cambio en la ruta metabólica, de la producción de ácidos a la producción de disolventes (Gottwald y Gottschalk, 1985).

Para que se pueda llevar a cabo el cambio en la ruta metabólica, de la acidogénesis a la solventogénesis, en la *C. acetobutyricum* son necesarias ciertas condiciones fisiológicas, i. e. se requiere una alta concentración de glucosa lo que indica que se necesita un catabolismo rápido (Fond et al., 1984). También se reportó que para que la *C. acetobutyricum* pueda llevar a cabo dicho cambio requiere tener un pH interno de 5.5 con valores de pH externos dentro del rango de 5.9 a 4.3 (Gottwald y Gottschalk, 1985).



Cuando la TCO varió entre 5 y 30 kg-glucosa $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$ el flujo de carbono fue lo suficientemente bajo para evitar el cambio de la ruta metabólica proporcionando la energía necesaria para el mantenimiento y desarrollo de las células. Sin embargo, al aumentar la TCO a 60 kg-glucosa $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$ el flujo de carbono a través de la célula fue lo suficientemente alto para propiciar el cambio de la ruta metabólica, de la producción de ácidos a la producción de disolventes.

7.3.4 EVOLUCIÓN DE LAS RESISTENCIAS DE LA MEMBRANA

Los datos del flujo permeado se convirtieron en permeabilidades, para las diferentes TCO ensayadas, para hacer que los resultados fueran independientes de las variaciones de la presión transmembrana (Figura 7.4). La permeabilidad, definida como la relación entre el flujo permeado y la presión transmembrana observada, es una medida indirecta del grado de colmatación de la membrana.

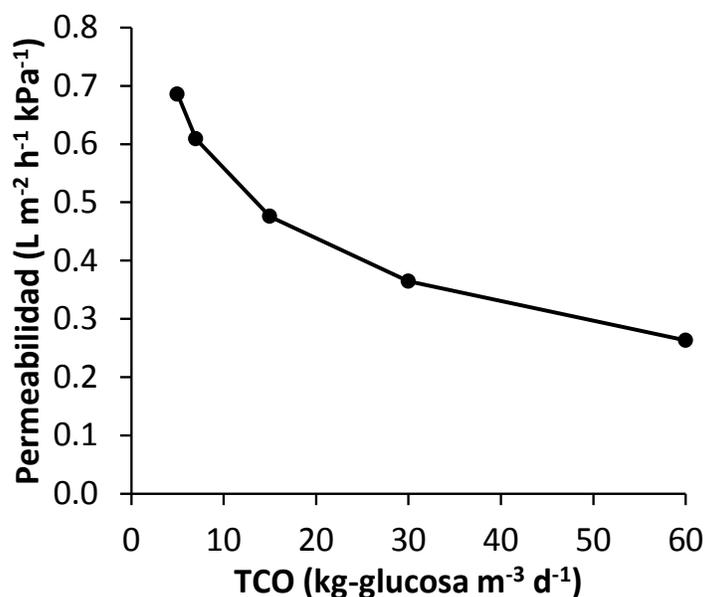


Figura 7.4. Evolución de la permeabilidad de la membrana a las distintas TCO aplicadas.

Independientemente de la TCO aplicada el flujo permeado se mantuvo en $11.3 \text{ L m}^{-2} \text{h}^{-1}$, con la intención de conservar el TRH aplicado y evitar afectar el proceso de producción de bio-hidrógeno. A medida que se incrementó la TCO la permeabilidad de la membrana disminuyó y la frecuencia del lavado de la membrana aumentó. Esto se pudo deber al incremento en la producción de EPS los cuales formaron una capa que dificultó el permeado a través de la membrana (Psoch y Schiewer, 2006).



Para cada condición de TCO se calcularon las resistencias parciales y la resistencia total de la membrana (Figura 7.5). El incremento de la TCO se correlacionó con el aumento en la resistencia de la membrana. Mientras que la TCO aumentó 12 veces (de 5 a 60 kg-glucosa $m^{-3} d^{-1}$) la resistencia total de la membrana aumentó de 3 veces (Figura 7.5A). La resistencia intrínseca de la membrana y la resistencia debido a la formación de la biotorta representaron el 12% y el 20% de la resistencia total de la membrana, respectivamente. En todos los casos la principal resistencia se debió al bloqueo de poros.

Debido a su tamaño (0.1–15 μm) los microorganismos quedan retenidos en los sistemas con membranas de microfiltración ($\geq 0.1 \mu m$) y ultrafiltración (0.01 – 0.1 μm) y se pueden adherir a las membranas mediante los EPS (Charfi et al., 2012). Las proteínas y los aminoácidos son componentes hidrofóbicos de los EPS mientras que los polisacáridos son componentes hidrofílicos. Los componentes hidrofílicos de los EPS, como los polisacáridos, pueden favorecer la interacción entre células y fortalecer la estructura microbiana mediante la formación de una matriz polimérica (Li et al., 2008).

Un lodo con una relación PN/PS alta tiene características tales que permiten una mayor adherencia por lo que favorecen la formación de la biotorta (Dereli et al., 2012). La poca contribución de la formación de la biotorta a la resistencia total de la membrana se debió que la relación PN/PS fue baja (0.43 a 0.53), por lo que la biomasa no se pudo adherir fácilmente a la superficie de la membrana.

La producción de EPS (proteínas y polisacáridos) se correlacionó con el incremento en la resistencia de la membrana (Figura 7.5B). Las proteínas producidas por los gránulos tuvieron un efecto mayor sobre el incremento de la resistencia total de la membrana. Esto se pudo deber a que los EPS se adsorbieron o se depositaron en los poros de la membrana (Lee et al., 2008a), lo cual redujo su área y por lo tanto se incrementó la resistencia a la filtración, reduciendo también la permeabilidad de la membrana.

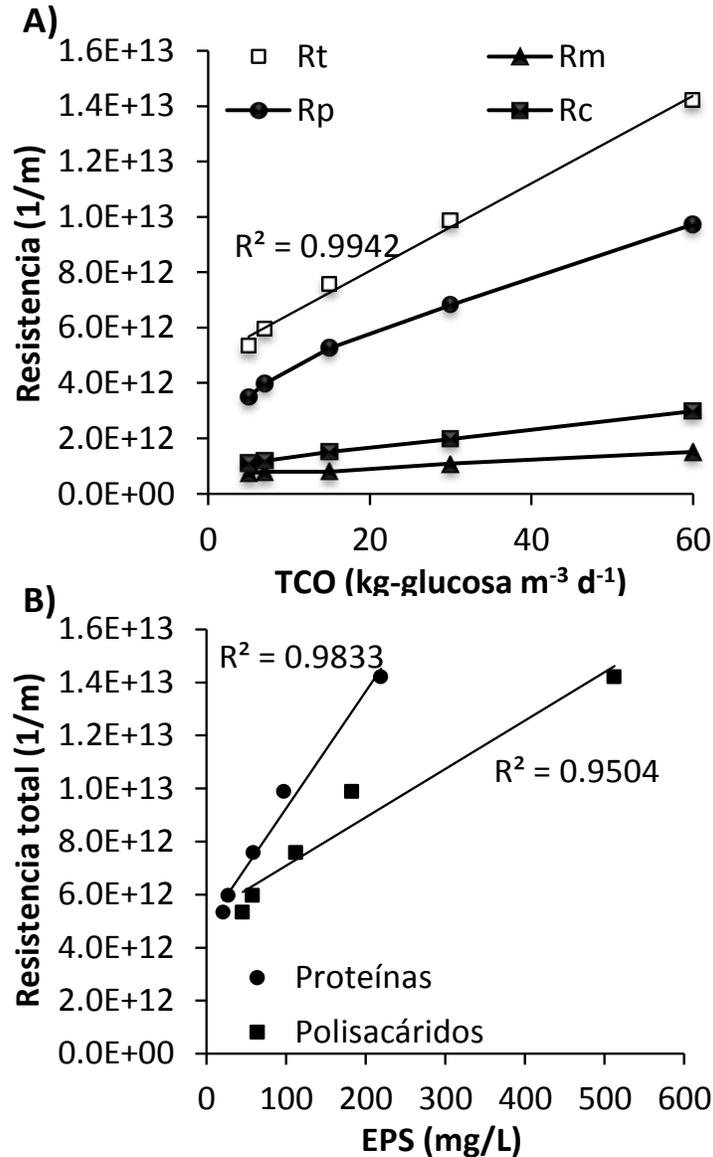


Figura 7.5. Evolución de la resistencia de la membrana a diferentes TCO. A) Cambio de las resistencias parciales de la membrana y B) variación de la resistencia total de la membrana con la producción de EPS.

La frecuencia del lavado de la membrana incrementó conforme se aumentó la TCO. La recuperación promedio de la membrana después del lavado químico fue del 88% ± 8%. El aumento de la resistencia de la membrana estuvo controlada por los solutos en vez del lodo (Li et al., 2005), lo cual explica por qué la resistencia por bloqueo de poros fue la principal causa del incremento de la resistencia de la membrana. Este tipo de colmatación concuerda con lo reportado por Li et al. (2005).



7.3.5 BALANCE DE ELECTRONES-EQUIVALENTES

En el rango de TCO de 5 a 30 kg-glucosa $m^{-3} d^{-1}$, el ajuste del balance de masa de electrones fue satisfactorio; las pérdidas máximas de electrones de 9% indican un comportamiento estable en estos rangos de TCO (Tabla 1). Los electrones utilizados en la producción de hidrógeno estaban en el rango de 16 - 20% de los electrones alimenta al sistema con TCO de 5 a 30 kg-glucosa $m^{-3} d^{-1}$; sin embargo, a una TCO mayor sólo el 2% de la electrones alimentados inicialmente se utilizaron en la producción de hidrógeno. A una TCO de 60 kg-glucosa $m^{-3} d^{-1}$, las pérdidas de electrones aumentaron a 46%, lo que indica que el proceso de producción de hidrógeno era inestable. Posiblemente, a esta TCO, los principales sumideros de electrones fueron los metabolitos solubles producidos no medidos y la producción de biomasa.

Tabla 7.1. Balance de electrones-equivalentes (como mg-DQO) para las TCO probadas.

DQO glucosa ^a		DQO de los intermediarios ^b	DQO del H ₂ ^c	Suma de DQO ^d	Electrones equivalentes no medidos (%)
Inicial	Residual				
2432	43	1782	423	2248	8
3243	58	2499	648	3205	1
7093	106	5524	1389	7020	1
14187	624	9998	2308	12930	9
28373	5675	9127	579	15380	46

Los valores en la tabla están expresados en mg-DQO excepto cuando se indican otras unidades

^a Calculado como [mg-DQO L⁻¹ de glucosa] x 1.9 L

^b Calculado como [suma de los mg-DQO L⁻¹ de los AGV y el etanol] x 1.9 L

^c Calculado como [mol H₂/mol glucosa] x mol de glucosa removida x [16 g-DQO/mol H₂] x 1000 mg/g

^d Calculado como la suma en mg-DQO del H₂ y los intermediarios totales de las columnas anteriores

^e Calculado como [mg- DQO de la glucosa alimentada – Suma de DQO] / mg- DQO de la glucosa alimentada x 100%



Es probable que los electrones-equivalentes no medidos se encontraran presentes en el efluente con otros metabolitos solubles, tales como el metanol (De Amorim et al., 2012), butanol (Kyazze et al., 2006), butinol (Shen et al., 2009), caproato (Akutsu et al., 2009), lactato (Kyazze et al., 2006) y las sustancias exopoliméricas producidas (Carrillo-Reyes, 2012).

7.4 CONCLUSIONES PARCIALES

Se evaluó la influencia de la TCO en un biorreactor con membranas sumergidas inoculado con lodo anaerobio granular y se encontró que la producción de bio-hidrógeno se mantuvo estable a TCO de hasta $30 \text{ kg-glucosa m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, mientras que una carga mayor resultó en una producción inestable. La máxima producción de bio-hidrógeno se obtuvo a una TCO de $30 \text{ kg-glucosa m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. El principal mecanismo de colmatación de la membrana se debió al bloqueo de los poros, lo cual disminuyó su permeabilidad. Debido a los resultados obtenidos, es posible indicar que el control de la TCO podría tener repercusiones importantes en el desempeño y estabilidad de los sistemas de producción de bio-hidrógeno.





CAPÍTULO 8.
INFLUENCIA DEL TIEMPO DE RESIDENCIA
HIDRÁULICA EN LA PRODUCCIÓN
DE BIO-HIDRÓGENO

Publicaciones derivadas de este capítulo

Hernández-Mendoza CE, Buitrón G. Effect of the hydraulic retention time on hydrogen production in a granular based membrane bioreactor. *En preparación*.

Hernández-Mendoza CE, Buitrón G (2013). Increasing the hydrogen production through the hydraulic retention time in a membrane biorreactor. IWA-Mexico Young Water Professionals. 24-26 de Abril. San Luis Potosí, México.

Hernández-Mendoza CE, Buitrón, G (2013). Enhancing the hydrogen production through the organic loading rate and the hydraulic retention time. 13th World Congress on Anaerobic Digestion. 25-28 de Junio. Santiago de Compostela, España.





8.1 INTRODUCCIÓN

El tiempo de residencia hidráulica (TRH) es un parámetro de operación importante que afecta a la producción de bio-hidrógeno. En los biorreactores CSTR, el uso de TRH cortos afecta el crecimiento de las arqueas metanogénicas debido a que su tasa de crecimiento (0.0167 a 0.02 h^{-1}) es menor que la de las bacterias productoras de hidrógeno (0.172 h^{-1}). Sin embargo, un TRH corto puede reducir la eficiencia de conversión del sustrato con la consiguiente reducción en la producción de bio-hidrógeno. Por lo tanto, resulta necesario definir un rango o un valor óptimo del TRH para incrementar la producción de bio-hidrógeno.

La principal desventaja del biorreactor CSTR para la producción de bio-hidrógeno radica en que el uso de TRH cortos, i. e. $\text{TRH} < 6$ h, resulta en el lavado de la biomasa, baja producción de hidrógeno e inestabilidad del sistema (Wu et al., 2008). Por lo tanto, es necesario disponer de una configuración de biorreactor que permita reducir el TRH y evite el lavado de la biomasa para mejorar la producción de bio-hidrógeno.

Una forma de retener la biomasa es mediante el uso de gránulos o membranas. Las propiedades físicas de los gránulos permiten controlar el lavado de la biomasa (Lettinga et al., 1980). Por otra parte, se ha reportado que los biorreactores con membranas pueden mejorar la producción de hidrógeno a TRH cortos (Oh et al., 2004). El uso de biorreactores con membranas inoculados con lodo granular, bajo condiciones anaerobias (Bohdziewicz, 2008; Chu et al, 2005a), permite retener a la biomasa en el biorreactor independientemente del TRH empleado. No obstante, éste tipo de sistemas no se ha estudiado ampliamente para la producción de bio-hidrógeno.

El objetivo de este capítulo fue evaluar la influencia del TRH en un biorreactor con membranas sumergidas inoculado con lodo anaerobio granular, a fin de obtener la condición que promueva una mayor producción de hidrógeno.

8.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos empleados en esta parte de la experimentación son los descritos en el Capítulo 3.

El inóculo se aclimató previamente en el biorreactor UASB bajo un régimen de flujo continuo (TRH: 5.5 h, pH: 4.5 y TCO: 5.0 $\text{kg-glucosa m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) sin utilizar el módulo de



membranas. Después de 66 días de operación continua se consideró que los gránulos anaerobios estaban aclimatados debido a que el contenido de hidrógeno en el biogás y la tasa de producción presentaron una variación máxima de $\pm 10\%$.

Después de aclimatar a la biomasa se instaló el módulo de membranas de ultrafiltración (fibras huecas, PVDF, 250 kDa, 0.04 m², tamaño de poro 0.1 μm , MEMOS GmbH) en el interior del biorreactor. El efecto del TRH, se evaluó mediante la reducción gradual del TRH de 5.5 h a 1.25 h, lo cual implicó aumentar el flujo permeado de la membrana de 9.03 L m⁻² h⁻¹ a 40.03 L m⁻² h⁻¹. La TCO se mantuvo constante a 30 kg-glucosa m⁻³ d⁻¹. Antes de cada cambio de TRH, la membrana se lavó químicamente para restaurar su desempeño. El biorreactor se operó por un periodo de al menos 52 veces el TRH aplicado para permitir que el sistema alcanzara el estado estacionario. El análisis de datos se realizó utilizando los valores promedio en el estado estacionario.

8.3 RESULTADOS

8.3.1 EFECTO SOBRE LOS GRÁNULOS MICROBIANOS

La reducción gradual del TRH de 5.5 h a 2.0 h provocó que el diámetro de los gránulos disminuyera de 1.9 ± 0.2 mm a 1.6 ± 0.2 mm (Figura 8.1). Al reducir el TRH hasta 1.25 h el diámetro de los gránulos se redujo a 1.3 ± 0.2 mm. La reducción del tamaño de los gránulos se debió a las altas condiciones hidrodinámicas establecidas en el biorreactor (Li et al, 2007c). El tamaño de los gránulos obtenidos están dentro del rango de 0.9 a 2.5 mm reportado por Fang et al. (2002).

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) excretadas por los gránulos productores de hidrógeno (GPH) consisten principalmente de polisacáridos y proteínas (Mu y Yu, 2006). La producción de EPS, proteínas y polisacáridos, disminuyó 66% conforme el TRH se redujo de 5.5 a 1.25 h. La relación proteínas/polisacáridos (PN/PS) disminuyó 43% (de 0.5 a 0.3) conforme el TRH se redujo 23% (de 5.5 a 1.25 h).

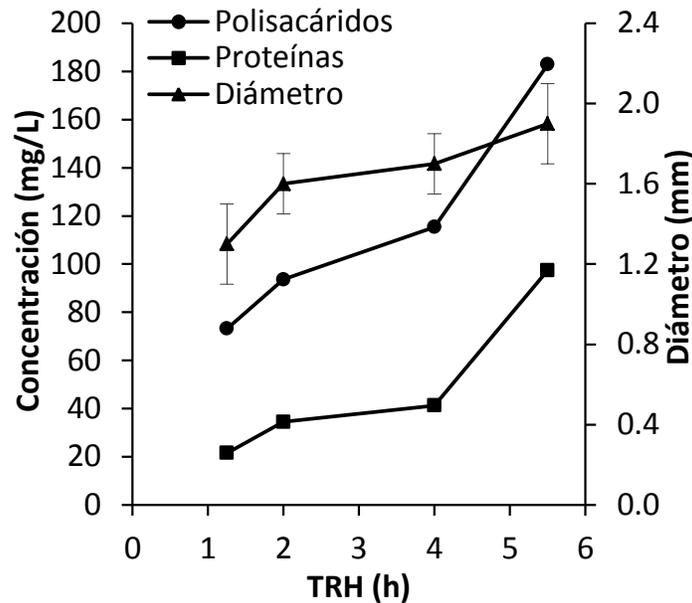


Figura 8.1. Evolución de la producción de EPS y variación del diámetro de los gránulos respecto a la reducción del TRH.

La disminución de la cantidad de EPS medidos se atribuyó a que al incrementar el flujo permeado 4 veces, la tasa de dilución fue mayor, por lo que pudo haber influenciado en la baja concentración de EPS medidos. Asimismo, es probable que la reducción del TRH, pudiera haber generado condiciones hidrodinámicas tales que, las fuerzas cortantes desarrolladas en el medio, provocaron una respuesta fisiológica en los gránulos promoviendo una baja producción de EPS (Menniti et al., 2009).

8.3.2 DESEMPEÑO DEL BIORREACTOR

La reducción gradual del TRH afectó el contenido de hidrógeno en el biogás producido, i. e. la concentración de hidrógeno disminuyó del $71\% \pm 2\%$ al $64\% \pm 4\%$ al reducir el TRH de 5.5 a 1.25 h. El alto contenido de hidrógeno en el biogás observado en este estudio ya se ha reportado previamente (Wong y Lau, 2011).

La Figura 8.2 muestra el desempeño del biorreactor durante la reducción del TRH. La tasa de producción de hidrógeno (TPH) y el rendimiento (Y_{H_2}) mostraron un comportamiento paralelo (Figura 8.2B). Sin embargo, la TPH fue más sensible a las variaciones del TRH en comparación con el Y_{H_2} . La reducción del TRH a 4 h incrementó 16% la TPH (de 409 ± 12 a 475 ± 15 mL- H_2 L $^{-1}$ h $^{-1}$) y se alcanzó un Y_{H_2} de 2.8 ± 0.1 mol H_2 /mol glucosa. No obstante, al reducir el TRH hasta 1.25 h la TPH se redujo 2.3 veces y el Y_{H_2} disminuyó 1.7 veces (1.7 ± 0.2 mol H_2 /mol



glucosa). Los rendimientos obtenidos son comparables con los reportados para cultivos mixtos (2.8 mol H₂/mol glucosa) (Hafez et al, 2010; Van Ginkel y Logan, 2005b) así como con el obtenido en un biorreactor CSTR con un cultivo puro de *Clostridium* sp. (1.7 mol H₂/mol glucosa) (Lin y Chang, 2004).

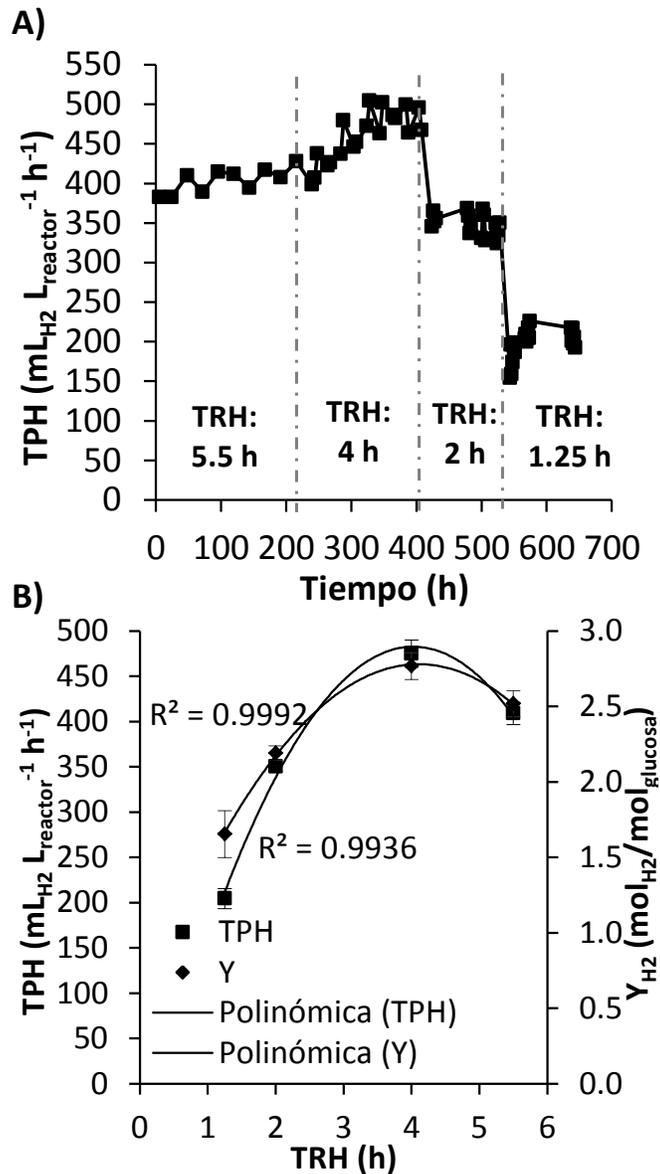


Figura 8.2. Evolución de la producción de bio-hidrógeno a diferentes TRH aplicados. A) Evolución de la tasa de producción y B) correlación con el rendimiento y la tasa de producción.

La correlación de la TPH y el Y_{H_2} con la reducción del TRH (Figura 8.2B) indica que la producción de bio-hidrógeno no varía de forma lineal con el TRH. Por lo tanto, una vez que se



alcanza la máxima producción de bio-hidrógeno no es posible continuar incrementándola mediante la reducción del TRH. El consumo de glucosa disminuyó del 92% al 85% cuando el TRH se redujo hasta 1.25 h. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Akutsu et al. (2009), quienes determinaron que al reducir el TRH de 6 a 3 h, la TPH y el Y_{H_2} disminuyeron debido a la reducción en la eficiencia de la degradación del sustrato.

8.3.3 METABOLITOS SOLUBLES PRODUCIDOS

La Figura 8.3 presenta la distribución de los metabolitos solubles producidos a los diferentes TRH ensayados. Durante todo el experimento no se detectó la producción de ácido propiónico. Esto se pudo deber a la sensibilidad de estos microorganismos al bajo pH (Wang et al., 2006a) y a la alta carga orgánica (De Amorim et al., 2012) aplicados. La ausencia de ácido propiónico, durante la producción de bio-hidrógeno, se ha reportado previamente (De Amorim et al., 2012).

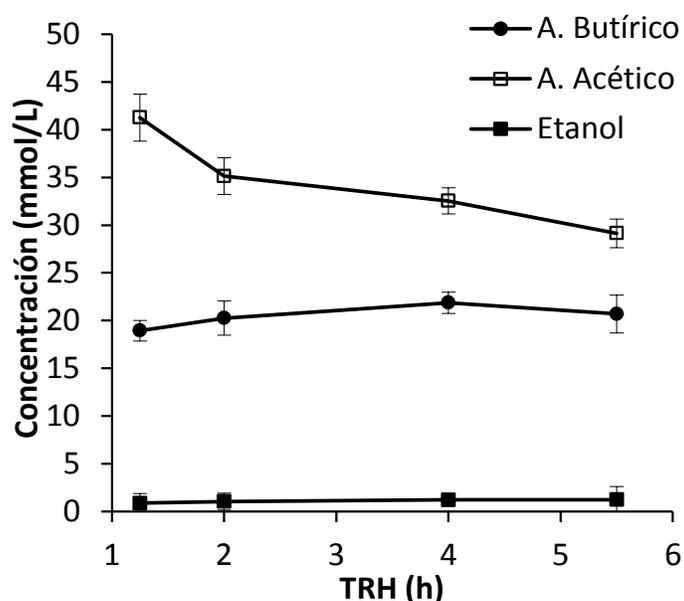


Figura 8.3. Distribución de los metabolitos solubles durante la variación del TRH.

La producción de ácido acético tendió a aumentar a medida que se redujo el TRH. La producción de etanol fue menor que los demás subproductos solubles. En el rango de TRH de 5.5 a 4 h se observó una fermentación ácido mixta del tipo ácido acético-ácido butírico, la cual es una ruta de producción de hidrógeno frecuentemente observada en cultivos mixtos (Reith et al., 2003; Nath y Das, 2004).



La reducción del TRH de 4 a 1.25 h aumentó la producción de ácido acético y disminuyó notablemente el Y_{H_2} . La producción de ácido acético aumentó 44% mientras que el TRH se redujo 4 veces. La reducción en la producción de bio-hidrógeno, a TRH menores de 4 h, se correlacionó con el aumento de la producción de ácido acético (Figura 8.4). Estos resultados sugieren que, conjuntamente a la producción de bio-hidrógeno, se desarrolló un proceso acetogénico lo cual redujo la producción de hidrógeno.

Las bacterias acetogénicas son microorganismos anaerobios estrictos capaces de catalizar la formación de ácido acético a partir de diferentes tipos de sustrato, e. g. H_2 - CO_2 , glucosa, etanol, lactato, piruvato y CO (Diekert y Wohlfarth, 1994). Éstas bacterias pueden producir butirato, etanol, lactato, succinato e hidrógeno, entre otros productos reducidos, mientras catalizan la formación de ácido acético (Drake et al., 2006).

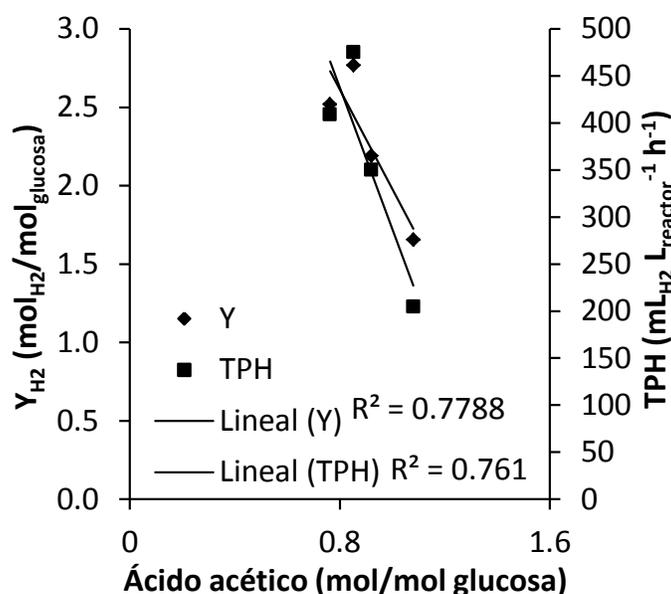


Figura 8.4. Variación de la producción de bio-hidrógeno con el aumento de la producción de ácido acético.

Aunque se ha observado el desarrollo de la actividad acetogénica en los sistemas de producción de bio-hidrógeno (Abreu et al., 2011; Cheng et al., 2012; Pendyala et al., 2012), ésta no se ha estudiado ampliamente. Kraemer y Bagley (2008) determinaron que el consumo de hidrógeno, por acetogénesis, fue de menos del 11% de la producción de hidrógeno observada. Arooj et al. (2008) encontraron que la reducir el TRH se incrementó la producción de ácido acético, debido al desarrollo de un proceso homoacetogénico, alcanzando una producción



máxima de ácido acético debida al consumo de hidrógeno del 54% a un TRH de 4 h. Por otro lado, Dinamarca et al. (2011), encontraron que el consumo de hidrógeno, durante la acetogénesis, fue del 24% al 70%. Esto significa que el proceso de acetogénesis puede llegar a afectar significativamente la producción de bio-hidrógeno.

La Tabla 8.1 presenta la estimación de la producción de ácido acético debido al proceso acetogénico. Los resultados mostraron que a TRH de hasta 4 h la influencia del proceso acetogénico no fue considerable. Esto indica que el ácido acético se produjo como resultado de la transformación de glucosa a hidrógeno por la vía glicolítica (Luo et al., 2011). Sin embargo, conforme se redujo el TRH hasta 1.25 h, el ácido acético producido debido a la acetogénesis aumentó hasta el 23% del total de ácido acético producido. Debido al consumo de hidrógeno por las bacterias acetogénicas el rendimiento de la producción de hidrógeno se redujo un 53% respecto al teórico esperado, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (Arooj et al., 2008; Dinamarca et al., 2011).

Tabla 8.1. Estimación del consumo de hidrógeno por acetogénesis.

TRH (h)	Producción de ácido acético medido	Producción de ácido butírico medido	Y_{H_2}	Ácido acético producido por acetogénesis ^a	Producción de ácido acético medido / ácido acético producido por acetogénesis (%)
5.5	0.75	0.53	2.52	0.01	1
4	0.84	0.56	2.77	0.01	1
2	0.90	0.52	2.19	0.11	12
1.25	1.06	0.49	1.65	0.24	23

Los valores en la tabla están expresados en mol/mol de glucosa excepto cuando se indican otras unidades

a Calculada como $[(2 \times \text{Producción de ácido acético medido}) + (2 \times \text{Producción de ácido butírico medido}) - (Y_{H_2})] \times (1/6)$

Es posible que algunos microorganismos del género *Clostridium* pudieron haber estado en el sistema debido a que éste tipo de bacterias, tales como *C. butyricum*, *C. acetobutyricum*, *C.*



aceticum y *C. pasteurianum*, pueden producir ácido acético, ácido butírico, succinato, etanol, H_2 y CO_2 (Madigan et al., 2009). La *Butyrubacterium methylotropicum* puede crecer a pH bajos y produce acetato, butirato, dióxido de carbono e hidrógeno, como productos principales, cuando crece en medios con glucosa (Lynd y Zeikus, 1983).

El uso de un pH bajo y un TRH corto permitió suprimir la producción de metano y ácido propiónico, favoreciendo la producción de hidrógeno, no fue posible suprimir la actividad acetogénica del inóculo. Aunque se ha reportado que el uso de TRH cortos favorece la producción de bio-hidrógeno, en este caso, favoreció el desarrollo de la actividad acetogénica del inóculo. Por lo tanto, es recomendable estudiar a mayor detalle la influencia del proceso de acetogénico, durante la producción de bio-hidrógeno, a fin de esclarecer las condiciones que promueven el cambio de la producción de hidrógeno a su consumo.

8.3.4 EVOLUCIÓN DE LAS RESISTENCIAS DE LA MEMBRANA

El flujo permeado se incrementó de 9.03 a 40.03 $L\ m^{-2}\ h^{-1}$ conforme se disminuyó el TRH de 5.5 h a 1.25 h para obtener el TRH requerido. La permeabilidad varió linealmente respecto a la variación del TRH (Figura 8.5) y se redujo 62% conforme el TRH se acortó hasta 1.25 h. Esto sugiere que a medida que se reduce el TRH la membrana tiende a colmatarse más rápido debido al incremento del flux.

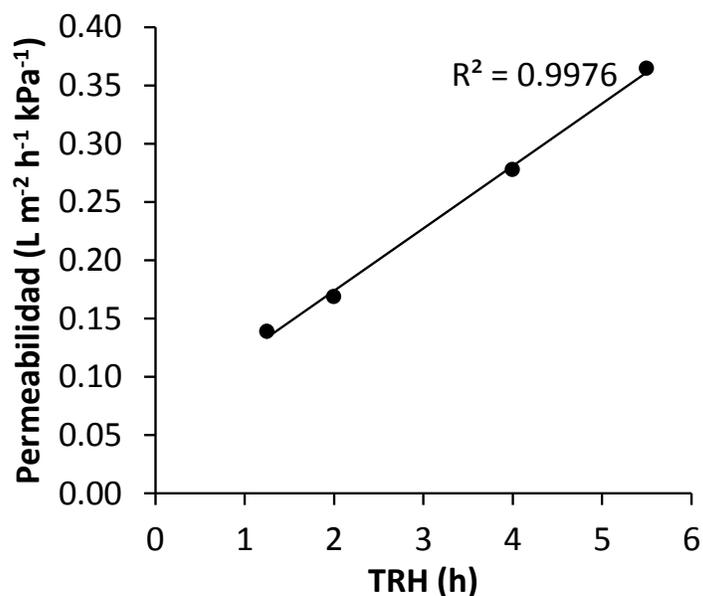


Figura 8.5. Evolución de la permeabilidad de la membrana a diferentes TRH.



La Figura 8.6 presenta la evolución de la resistencia de la membrana a los diferentes niveles de TRH evaluados. La reducción del TRH y el incremento del flux correlacionaron con la resistencia total de la membrana (Figura 8.6B). La resistencia total de la membrana aumentó 2.7 veces mientras que el TRH se redujo 4.4 veces. La resistencia intrínseca de la membrana proporcionó el 12% de la resistencia total de la membrana, en los distintos niveles de TRH ensayados.

La aportación de la formación de la biotorta a la resistencia total de la membrana se incrementó del 20% al 25% conforme el TRH se redujo hasta 1.25 h. Es posible que las altas condiciones hidrodinámicas desarrolladas en el biorreactor, debido a la reducción del TRH, generaran fuerzas cortantes que desprendieron parte de la biomasa del gránulo. Esta biomasa pudo adherirse a la membrana debido a la acción de los EPS, de los cuales se ha reportado que tienden a incrementar su capacidad de adherencia conforme se incrementa la fuerza cortante en el sistema (Menniti et al., 2009).

Durante la filtración, los microorganismos (0.1 – 15 μm) quedaron retenidos en el sistema debido al tamaño de poro de la membrana (0.1 μm) y se adhirieron a la superficie de la misma (Charfi et al., 2012) mediante los componentes hidrofílicos de los EPS, i. e. los polisacáridos, los cuales favorecieron su adhesión mediante la formación de una matriz polimérica (Li et al., 2008). Esto resultó en la reducción de la permeabilidad y en el correspondiente incremento de la resistencia de la membrana.

La resistencia debida al bloqueo o reducción del diámetro de los poros varió del 63% al 68%. Este resultado indica que el principal mecanismo de colmatación de la membrana se debió al bloqueo o reducción del diámetro de los poros de la membrana. Las proteínas, las cuales son los componentes hidrofóbicos de los EPS, tuvieron un mayor impacto en el incremento de la resistencia de la membrana (Figura 8.6C). Seo et al. (2005) indicaron que la fracción hidrofóbica de los compuestos orgánicos tiene un efecto mayor en la colmatación de la membrana que los compuestos hidrofóbicos.

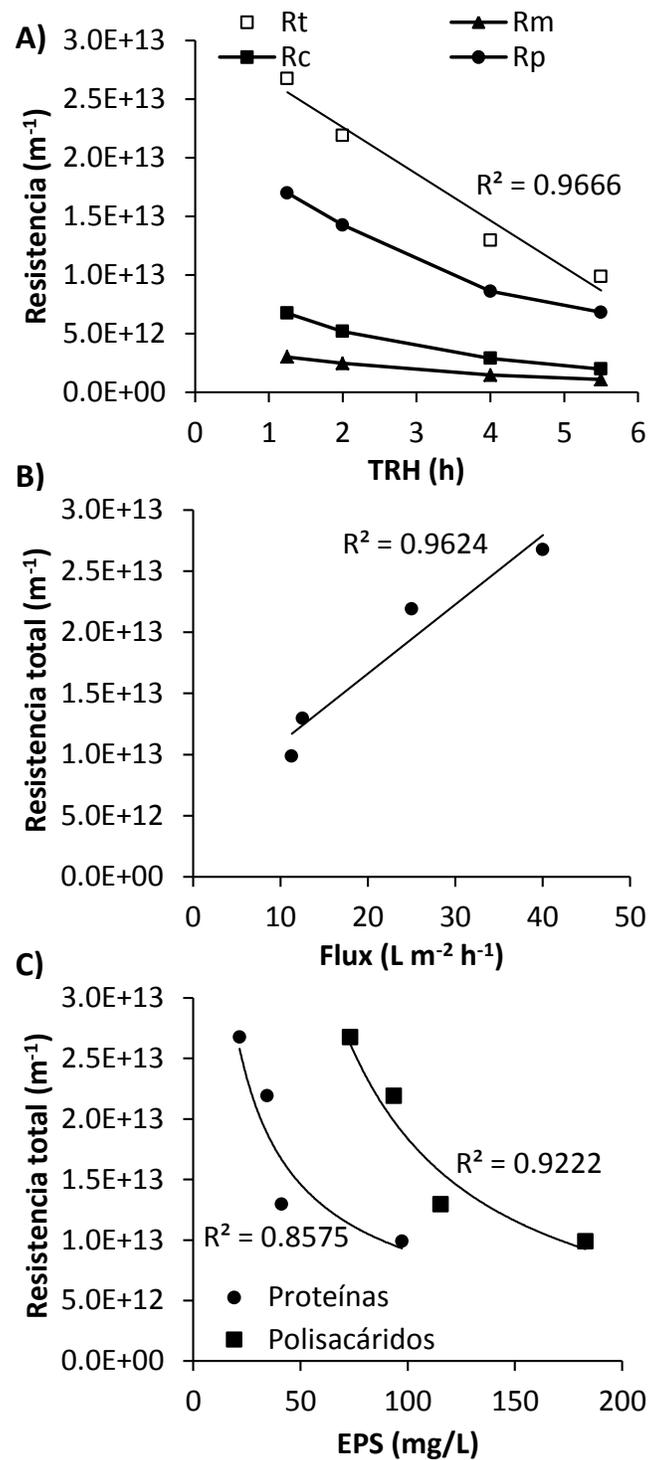


Figura 8.6. Evolución de la resistencia de la membrana a diferentes TRH. A) Resistencias parciales, B) variación respecto al flux y C) contribución de los EPS a la colmatación de la membrana.



Debido a la fuerte reducción del flujo permeado a través de la membrana se incrementó la velocidad de colmatación y, con ello, la frecuencia de lavado de la misma. La recuperación del desempeño de la membrana, después de lavado químico de la membrana, fue del $80\% \pm 5\%$. Es posible que durante la filtración, los EPS se hayan adsorbido en la membrana (Lee et al., 2008) y/o pudieron haber bloqueado los poros, incrementando la resistencia hidráulica del flujo permeado. Debido a los diferentes efectos que tiene los EPS se les considera como los principales responsables del proceso de colmatación de la membrana (Judd, 2008; Charfi et al., 2012). El mecanismo de colmatación observado se ha reportado previamente en biorreactores con membrana a base de lodo granular (Li et al., 2005).

8.3.5 BALANCE DE ELECTRONES-EQUIVALENTES

La Tabla 8.2 presenta el balance de masa como electrones-equivalentes para cada TRH ensayado.

Tabla 8.2. Balance de electrones-equivalentes (como mg-DQO) para los diferentes TRH.

TRH (h)	DQO glucosa ^a		DQO de los intermediarios ^b	DQO del H ₂ ^c	Suma de DQO ^d	Electrones equivalentes no medidos (%)
	Inicial	Residual				
5.5	14187	1135	10090	2739	13964	2
4.0	14187	1206	10859	2994	15059	-6
2.0	14187	1404	10654	2334	14392	-1
1.25	14187	2128	10972	1663	14763	-4

Los valores en la tabla están expresados en mg-DQO excepto cuando se indican otras unidades

^a Calculado como $[\text{mg-DQO L}^{-1} \text{ de glucosa}] \times 1.9 \text{ L}$

^b Calculado como $[\text{suma de los mg-DQO L}^{-1} \text{ de los AGV y el etanol}] \times 1.9 \text{ L}$

^c Calculado como $[\text{mol H}_2/\text{mol glucosa}] \times \text{mol de glucosa removida} \times [16 \text{ g-DQO/mol H}_2] \times 1000 \text{ mg/g}$

^d Calculado como la suma en mg-DQO del H₂ y los intermediarios totales de las columnas anteriores

^e Calculado como $[\text{mg-DQO de la glucosa alimentada} - \text{Suma de DQO}] / \text{mg-DQO de la glucosa alimentada} \times 100\%$



El balance de electrones ajusta satisfactoriamente debido a que la mayor cantidad de electrones-equivalentes no medidos fue del 6%. La cantidad de electrones-equivalentes utilizados para la producción de bio-hidrógeno disminuyó del 21% al 12% conforme se redujo el TRH a 1.25 h, lo cual se puede explicar por el consumo de hidrógeno derivado del desarrollo del procesos acetogénico.

A pesar de que se redujo 4 veces el flujo permeado a través de la membrana, y tomando en cuenta la Ley de Henry ($k_{H_2,35^\circ C}: 8.24 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ atm}^{-1}$), la concentración de hidrógeno disuelto en el agua es de 0.2 mmol/L para el caso del TRH de 1.25 h, lo cual representa menos del 1% de la producción medida del bio-hidrógeno, por lo que no representa una pérdida considerable de electrones no medidos. Los electrones-equivalentes no medidos pudieron haber estado en el efluente junto con otros productos intermediarios, tales como el formiato, lactato y caproato, así como con las sustancias exopoliméricas producidas (Liu y Fang, 2002; Akutsu et al, 2009; Dinamarca y Bakke, 2012).

8.4 CONCLUSIONES PARCIALES

Se evaluó la influencia del TRH en un biorreactor con membranas sumergidas inoculado con lodo anaerobio granular y se observó que la tasa de producción de bio-hidrógeno fue más sensible que el rendimiento de la producción de bio-hidrógeno a las variaciones del TRH. La producción de bio-hidrógeno alcanzó un máximo cuando el TRH se redujo a 4 h. El uso de TRH menores favoreció el consumo de hidrógeno por acetogénesis afectando la eficiencia de la producción de hidrógeno. El principal mecanismo de colmatación de la membrana se debió al bloqueo de los poros. Conforme se redujo el TRH la permeabilidad de la membrana disminuyó.



CAPÍTULO 9.
OPTIMIZACIÓN TEÓRICA DE LA PRODUCCIÓN DE
BIO-HITANO EN UN SISTEMA DE DOS ETAPAS

Publicaciones derivadas de este capítulo

Hernández-Mendoza CE, Latrille E, Buitrón G (2013). Predicting the hydrogen content in the biohythane production in a two-stage anaerobic system. IWA-Mexico Young Water Professionals. April, 24-26. San Luis Potosí, México.





9.1 INTRODUCCIÓN

Se ha señalado al hidrógeno como el vector energético más limpio debido a que su combustión sólo produce agua. Por otra parte, se ha indicado que el metano es la fuente de energía más limpia en comparación con otros combustibles de origen fósil. El metano no sólo se emplea como sustancia química sino que también se utiliza en la industria del transporte en la forma de gas natural comprimido y en el suministro de gas para consumo doméstico, comercial e industrial.

Se ha reportado que la adición de hidrógeno al metano mejora su combustión y proporciona algunos beneficios ambientales. A la mezcla de hidrógeno con metano se le denomina hitano o hitano, y cuando la mezcla de hidrógeno y metano se obtiene mediante algún proceso biológico recibe el nombre de bio-hitano o bio-hitano (Cavinato et al., 2012). La producción de hidrógeno y metano a partir de materiales fósiles es insostenible y requiere mucha energía.

Actualmente, la mayor parte de la producción de hidrógeno se realiza mediante el uso de materiales de origen fósil. Con el fin de producir el hitano de forma sostenible, es necesario producir el hidrógeno mediante un proceso ambientalmente amigable, o bien, mediante algún proceso biológico. En este sentido, el tratamiento anaerobio es una manera adecuada para producir el bio-hidrógeno y el bio-metano, al tiempo que se trata el agua residual.

El tratamiento anaerobio consta de cuatro etapas bien definidas con la interacción de diferentes microorganismos: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. Para favorecer la producción de bio-hidrógeno, el proceso se tiene que detener en la acidogénesis. El efluente del proceso acidogénico puede emplearse para producir bio-metano. Por lo tanto, resulta conveniente el uso de un sistema de tratamiento en dos etapas. Para producir el bio-hitano, tanto el bio-hidrógeno como el bio-metano se pueden producir en reactores independientes y al final del proceso ambas corrientes gaseosas se mezclan para controlar el contenido de bio-hidrógeno. El principal reto consiste en integrar de manera eficiente las dos etapas para producir continuamente el bio-hitano. (Cavinato et al., 2012)

Hasta ahora, la producción industrial del bio-hitano está limitada por la producción y la instrumentación asociada con el bio-hidrógeno, ya que es necesario tener una relación de H_2/CH_4 del 5% al 20% para obtener los beneficios de ésta mezcla (Cavinato et al, 2012). El interés en el uso del bio-hitano como combustible en la industria del transporte se debe,



principalmente, a que reduce la emisión de gases contaminantes como los óxidos de nitrógeno y el dióxido de carbono, mejora la eficiencia de los motores y disminuye la energía requerida para el arranque, su uso no requiere de cambios significativos en la infraestructura existente, dependiendo de la composición del hitano, varios de los vehículos que actualmente emplean gas natural como combustible no necesitarían modificarse para poder emplear al hitano como combustible. (Midha et al., 2011; Cavinato et al., 2012; Mével et al., 2012; Villante y Genovese; 2012)

El objetivo de este capítulo fue determinar la factibilidad teórica de obtener una producción de bio-hitano con contenido de hidrógeno entre el 5% y 20% mediante un balance de masas de un proceso de digestión en dos etapas.

9.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Del balance de masa en el biorreactor acidogénico se obtuvieron las ecuaciones 9.1 a 9.5. Del balance de DQO se obtuvo la ecuación 9.1

$$DQO_{R1} = \frac{g_{glucosa}}{2L_{agua}} DQO_{glucosa} \frac{V_{alimentado_{R1}}}{V_{R1}} F_r - r_{DQO_{biomasa}} \quad (9.1)$$

$$DQO_{R1} = Y_{biomasa} DQO_{biomasa} \%glucosa_{transformada} \frac{g_{glucosa}}{2L_{agua}} \frac{V_{alimentado_{R1}}}{V_{R1}} F_r - r_{DQO_{biomasa}}$$

Donde DQO_{R1} : es la demanda química de oxígeno en el biorreactor R_1 ; $g_{glucosa}$: es la cantidad de glucosa alimentada en el biorreactor R_1 ; $2L_{agua}$: son los 2 L de agua utilizados para diluir la glucosa alimentada; V_{R1} es el volumen del biorreactor acidogénico; F_r : es la frecuencia de alimentación del biorreactor R_1 ; $r_{DQO_{biomasa}}$: es la DQO consumida para la producción de biomasa.

La ecuación 9.2 se obtuvo a partir del balance de los AGV producidos

$$rDQO_{AGV_{R1/R2}} = r_{DQO_{AAcético}} + r_{DQO_{AButírico}} F_r \quad (9.2)$$



$$r_{DQO_AAcético} = Y_{AAcético} DQO_{AAcético} PM_{AAcético} \%glucosa_{transformada} \frac{g_{glucosa}}{2L_{agua}} \frac{1}{PM_{glucosa}}$$

$$r_{DQO_AButírico} = Y_{AButírico} DQO_{AButírico} PM_{AButírico} \%glucosa_{transformada} \frac{g_{glucosa}}{2L_{agua}} \frac{1}{PM_{glucosa}}$$

Donde $r_{DQO_AGV-R1/R2}$ es la tasa de DQO de los AGV transferidos al biorreactor metanogénico durante la alimentación del biorreactor acidogénico; $r_{DQO_AAcético}$ es la DQO del ácido acético producido; $r_{DQO_AButírico}$ es la DQO del ácido butírico producido; $Y_{AAcético}$ es el rendimiento de la producción de ácido acético; $PM_{AAcético}$ es el peso molecular del ácido acético, $PM_{glucosa}$ es el peso molecular de la glucosa.

Las ecuaciones 9.3 y 9.4 se obtuvieron a partir del balance del biogás, considerando la transferencia del biogás producido en el biorreactor metanogénico hacia el biorreactor acidogénico durante la etapa de alimentación

$$r_{DQO_{H_2}} = Y_{H_2} DQO_{H_2} \%glucosa_{transformada} \frac{g_{glucosa}}{2L_{agua}} \frac{1}{PM_{glucosa}} \frac{V_{alimentado}}{V_{R1}} F_r \quad (9.3)$$

$$r_{DQO_{CH_4}} = r_{DQO_{CH_4-R1/R2}} \quad (9.4)$$

Donde $r_{DQO_{H_2}}$ es la tasa de producción de bio-hidrógeno; Y_{H_2} es el rendimiento de la producción de bio-hidrógeno; $V_{alimentado}$ es el volumen alimentado al biorreactor acidogénico; $r_{DQO_{CH_4}}$ es la tasa de bio-metano transferida al reactor acidogénico.

Para conocer la producción de CO_2 se hizo un balance de carbono y se obtuvo la ecuación 9.5

$$COT_{CO_2} = COT_{glucosa} - COT_{AGV} \quad (9.5)$$

En el caso del biorreactor metanogénico se utilizó el modelo propuesto por Bernard et al. (2001) debido a que se consideró que la velocidad de producción del bio-metano era superior al de la producción de bio-hidrógeno. La ecuación 9.6 se obtuvo del balance de la DQO



$$DQO_{salida} = \frac{K_{Si}\alpha D}{\mu_{max} - \alpha D} + DQO_{R1/R2} \quad (9.6)$$

Donde K_{Si} es la constante de saturación (Monod), α es el factor de heterogeneidad del proceso, μ_{max} es la tasa de crecimiento máxima de la biomasa (Monod), D es la tasa de dilución, $DQO_{R1/R2}$ es la DQO transferida del biorreactor acidogénico al biorreactor metanogénico.

La ecuación resultante para el balance de AGV es

$$AGV_{salida} = \frac{-\left(1 - \frac{\mu_{max}}{\alpha D}\right) + \sqrt{\left(1 - \frac{\mu_{max}}{\alpha D}\right)^2 - \left(\frac{4K_S}{K_I}\right)}}{\frac{2}{K_I}} + AGV_{R1/R2} \quad (9.7)$$

Donde AGV_{salida} son los AGV en el efluente, K_S es la constante de saturación (Haldane), K_I es la constante de inhibición (Haldane), $AGV_{R1/R2}$ son los AGV transferidos del biorreactor acidogénico al biorreactor metanogénico.

La cantidad de la biomasa acidogénica se calculó como

$$x_1^* = \frac{DQO_{vinasas}D - DQO_{salida}D + DQO_{R1/R2}D_{R1/R2}}{k_1\alpha D} \quad (9.8)$$

Donde k_1 es el rendimiento de la degradación de la DQO por la biomasa acidogénica, $DQO_{vinasas}$ es la DQO de las vinazas alimentadas, $D_{R1/R2}$ es la tasa de dilución debida a la transferencia del licor mezclado del biorreactor acidogénico al biorreactor metanogénico.

La biomasa metanogénicas se cuantificó con la ecuación 9.9

$$x_2^* = \frac{AGV_{vinasas}D - AGV_{salida}D + AGV_{R1/R2}D_{R1/R2} + k_2Dx_1^*}{k_3\alpha D} \quad (9.9)$$

Donde k_2 es el rendimiento de la producción de AGV por la biomasa acidogénica, k_3 es el rendimiento del consumo de AGV por la biomasa metanogénica.

La producción de metano se obtuvo mediante la ecuación 9.10



$$q_{CH_4} = k_6 \alpha D x_2^* \quad (9.10)$$

Donde k_6 es el rendimiento de la producción de metano.

La producción de CO_2 se determinó por un balance de carbono y se obtuvo la ecuación 9.11

$$COT_{CO_2} = COT_{vinazas} - COT_{AGV} - COT_{CH_4} \quad (9.11)$$

Finalmente, el contenido de bio-hidrógeno en el bio-hitano se obtuvo con la ecuación 9.12

$$H_{2_Biohitano} = \frac{\%H_2}{\%H_2 + \%CH_4} * 100\% \quad (9.12)$$

9.3 RESULTADOS

Para verificar el planteamiento de las ecuaciones se simularon tres condiciones de operación extremas. La Figura 9.1A muestra los resultados de la simulación cuando no se alimentó glucosa ni vinazas. Como no hay sustratos en ambos biorreactores no es posible generar gas en ambos biorreactores.

La Figura 9.1B presenta el resultado obtenido cuando sólo se alimentaron vinazas en el proceso metanogénico y no se alimentó glucosa en el biorreactor acidogénico. El biorreactor metanogénico se alimenta de manera continua por una entrada lateral y de manera discontinua por la sección de intercambio con el biorreactor acidogénico cada vez que éste se alimenta. Debido a forma en la que se opera el sistema, cuando se alimenta al biorreactor acidogénico éste trasfiere un volumen de licor mezclado al biorreactor metanogénico, mientras que el biorreactor trasfiere un volumen de gas hacia el biorreactor acidogénico. Debido a que únicamente se alimentaron vinazas por la entrada lateral del biorreactor metanogénico sólo se produjo metano y dióxido de carbono, mientras que en el biorreactor acidogénico no se produjo hidrógeno, por lo cual no fue posible formar el bio-hitano.

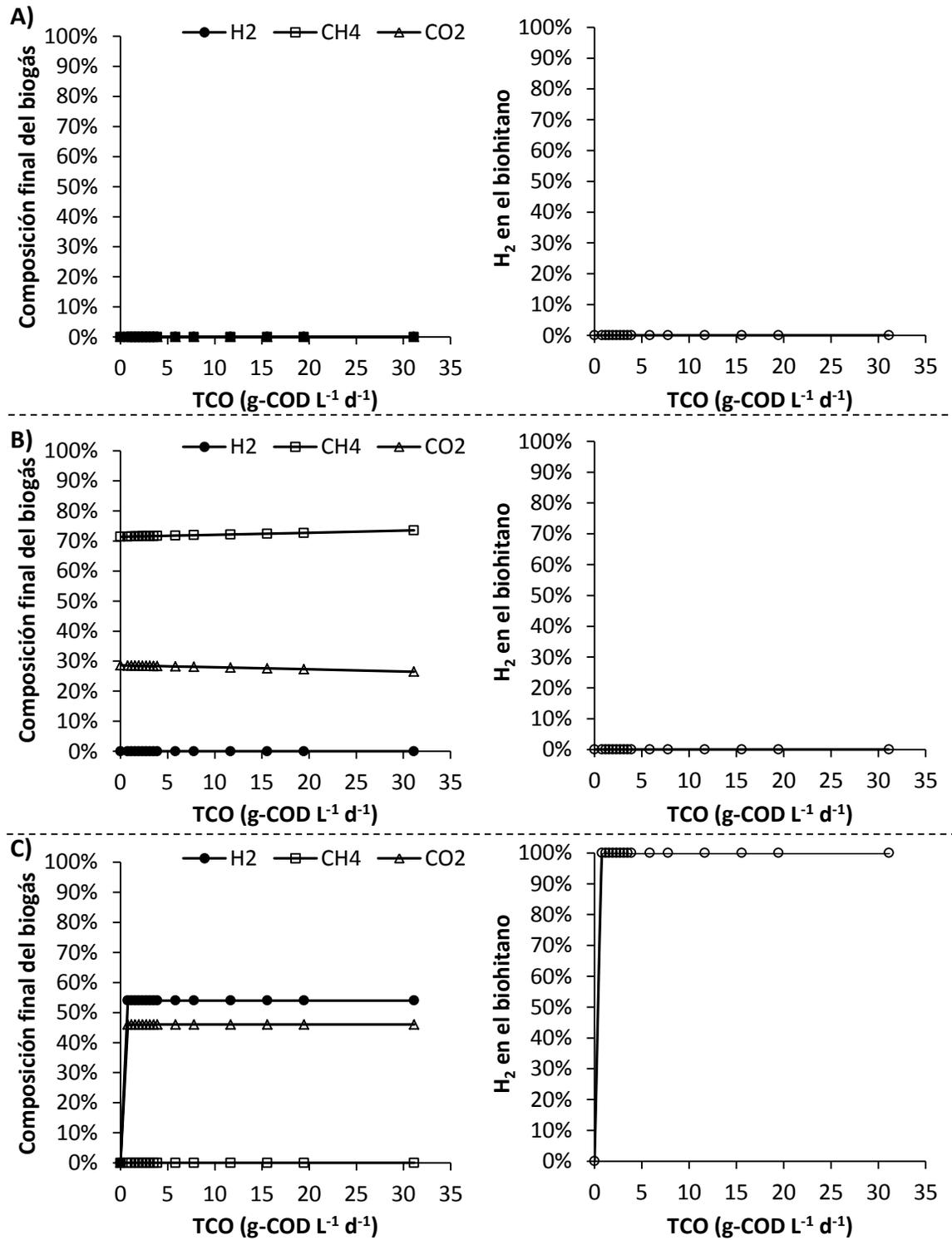


Figura 9.1. Producción de bio-hidrógeno A) sin alimentación de glucosa ni vinazas, B) alimentando sólo vinazas y C) alimentando únicamente glucosa.



La Figura 9.1C presenta el resultado obtenido cuando únicamente se alimentó glucosa en el biorreactor acidogénico y no se alimentó vinazas en el biorreactor metanogénico. Para evaluar esta condición se consideró que el biorreactor metanogénico estaba fuera de operación, por lo que no se generó metano. Así, el biogás producido estaba compuesto por hidrógeno y dióxido de carbono. Dado que la concentración de hidrógeno en el bio-hitano se calcula como la relación de la producción de hidrógeno y metano, la concentración de hidrógeno en el bio-hitano fue de 100%.

La influencia de la TCO en el biorreactor acidogénico a diferentes flujos de vinazas se muestra en la Figura 9.2. La composición de biogás en el reactor acidogénico prácticamente no varió a pesar del incremento en el flujo de vinazas en el biorreactor metanogénico. Sin embargo, el aumento en el flujo de vinazas de 50 hasta 180 L/d afectó la concentración de hidrógeno en el bio-hitano debido a que se incrementó la velocidad de producción de metano.

Los resultados indicaron que el sistema fue sensible a las variaciones del flujo de vinazas de vino en el biorreactor metanogénico. Por lo que, dependiendo del flujo de vinazas, se requiere de una TCO mayor en el biorreactor acidogénico para obtener el contenido de hidrógeno deseado en el bio-hitano.

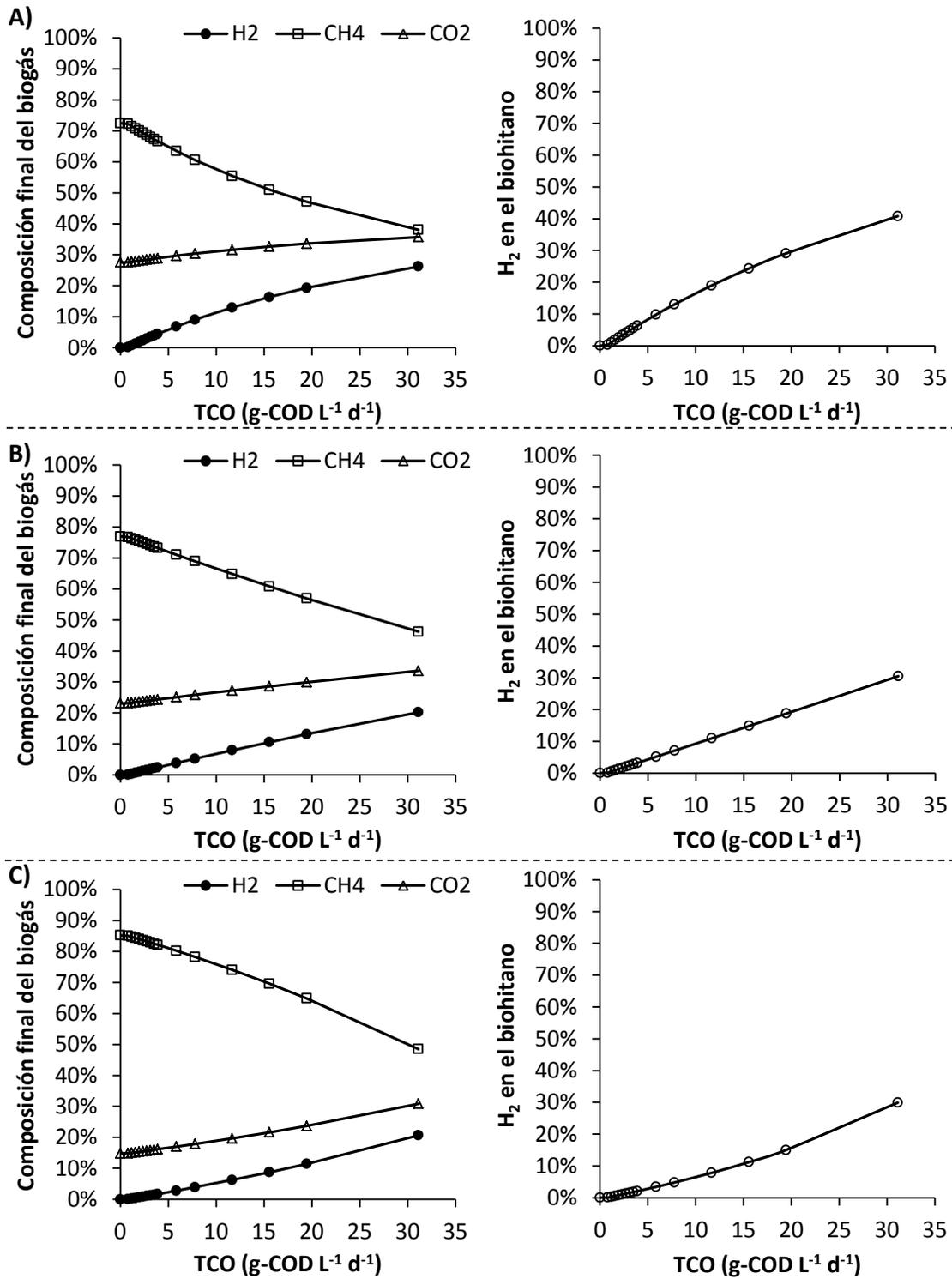


Figura 9.2. Producción de bio-hidrógeno a diferentes flujos de vinazas: A) 50 L/d, B) 108 L/d y C) 180 L/d.

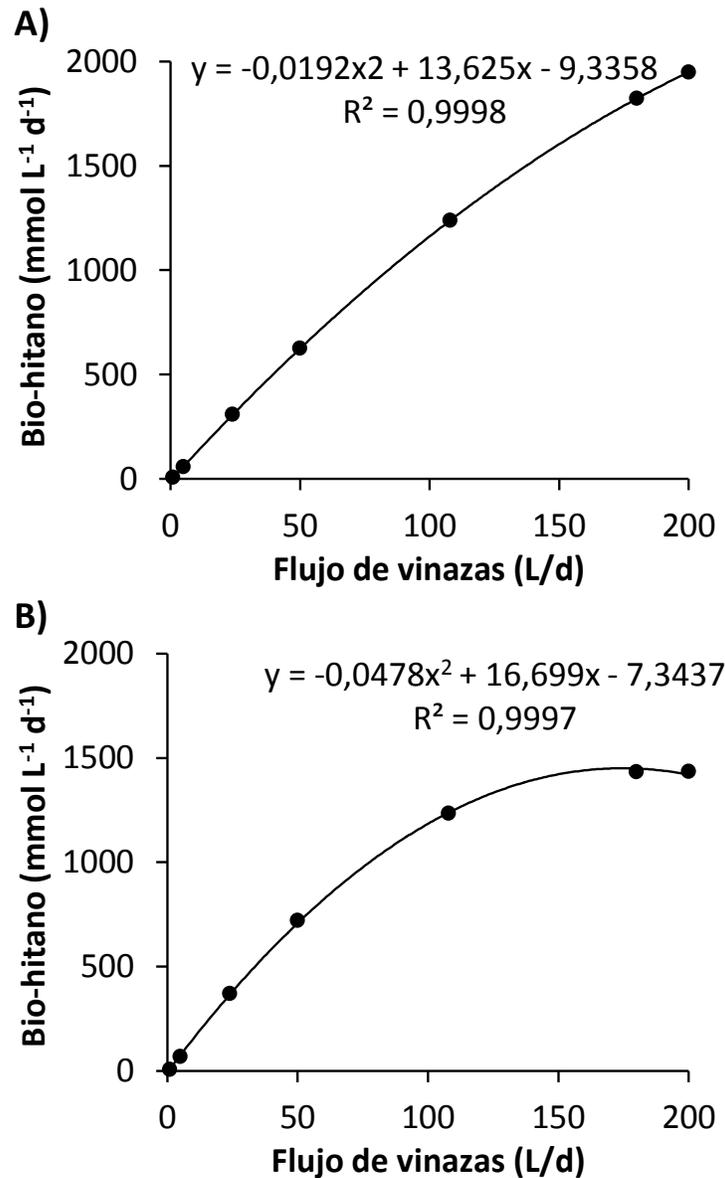


Figura 9.3. Evolución de la tasa de producción de bio-hitano a una concentración de bio-hidrógeno del A) 5% y B) 20%.

La Figura 9.3 muestra la producción de bio-hitano a diferentes flujos de vinazas para un contenido de hidrógeno del 5% y 20%. La tasa de producción del bio-hitano dependió del contenido de hidrógeno en la mezcla gaseosa. La tasa de producción de bio-hitano con una concentración del 5% de bio-hidrógeno fue mayor la del bio-hitano con un contenido de hidrógeno del 20%. A una alta concentración de hidrógeno en el bio-hitano, la tasa de producción del bio-hitano se reduce.



9.4 CONCLUSIONES PARCIALES

Se determinó la factibilidad teórica de la producción de bio-hidrógeno con un contenido de hidrógeno entre el 5% y 20%, mediante un balance de masas de un proceso de digestión en dos etapas, resultando factible su obtención con el sistema de tratamiento en dos etapas alimentando glucosa en el biorreactor acidogénico y vinazas de vino en el biorreactor metanogénico.



CONCLUSIONES





A partir de los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

Se llevó a cabo la evaluación de los parámetros operacionales de un biorreactor con membranas para la producción de hidrógeno partiendo de la transformación de la glucosa como única fuente de carbono y se determinó que a un pH inicial de 4.5 una carga orgánica de 30 kg-glucosa $\text{m}^{-3} \text{d}^{-1}$ y un tiempo de residencia hidráulica de 4 h se pudo maximizar la producción de hidrógeno. Bajos éstas condiciones de operación la velocidad de producción fue de $475 \pm 15 \text{ mL-H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con un rendimiento de $2.9 \pm 0.1 \text{ mol H}_2/\text{mol glucosa}$.

Se evaluó el efecto del pH inicial en la producción de bio-hidrógeno y se observó que a un pH inicial alto la producción de bio-hidrógeno se mantuvo mientras que a un nivel de pH inicial bajo el sistema se acidificó rápidamente lo cual resultó en la pérdida de producción de bio-hidrógeno. Asimismo, se encontró que no es necesario el uso de bicarbonatos como suplemento del nivel de alcalinidad de la alimentación del biorreactor debido a que, independientemente de la cantidad de alcalinidad agregada, no se observó un efecto positivo en la producción de bio-hidrógeno. Más aún, al incrementar el contenido de alcalinidad del sistema, la concentración de hidrógeno en el biogás disminuyó notablemente mientras que la concentración de dióxido de carbono incrementó considerablemente.

Posteriormente se evaluó la capacidad específica de producción de hidrógeno de los microorganismos que sedimentan (biomasa sedimentable) y de los microorganismos que no sedimentan (biomasa no sedimentable) mediante pruebas bioquímicas de producción de hidrógeno y se evidenció que la biomasa que forma agregados y sedimenta presentó una actividad específica de producción de hidrógeno mayor que la de la biomasa que permanece en suspensión. Debido a esto, se evaluó la capacidad específica de producción de hidrógeno del lodo anaerobio granular, el cual presentó una velocidad de producción de hidrógeno mayor que la obtenida con la biomasa sedimentable. Esto se pudo deber a que la diversidad microbiana establecida en el reactor fue diferente debido al efecto del tratamiento térmico aplicado a la biomasa sedimentable. A partir de los resultados obtenidos, resulta más apropiado el uso de lodo granular sin tratamiento previo como fuente de inóculo para la producción de hidrógeno.

En seguida se evaluó una metodología para la adaptación de los gránulos anaerobios que permitió la supresión de su actividad metanogénica y favoreció la producción de hidrógeno. Los resultados preliminares mostraron que la adaptación discontinua de los gránulos anaerobios



permitió generar hidrógeno pero no suprimió completamente la actividad metanogénica del inóculo debido a la aclimatación de los microorganismos metanogénicos a las condiciones de operación del reactor (pH: 5.5 y TRH: 24-6 h). Por otra parte, la adaptación continua de los gránulos anaerobios, bajo una presión de selección más fuerte (pH 4.5 y TRH de 5.5 h) dada principalmente por el uso de un pH y un TRH menores a los empleados en la operación en discontinuo, permitió suprimir la actividad metanogénica del inóculo y favoreció la producción de hidrógeno, la cual se llevó a cabo de manera estable. Se observó una distribución homogénea de las células y los β -polisacáridos en los gránulos adaptados para producir hidrógeno, lo cual contrastó con lo observado en los gránulos anaerobios inoculados. A pesar de que se utilizó el mismo tipo de inóculo, las diferencias en la operación de los biorreactores resultaron en el establecimiento de diferentes tipos de microorganismos. Sin embargo, en ambos sistemas se observó la presencia de microorganismos del género *Clostridium*, los cuales son los principales responsables de la producción de hidrógeno.

Después se evaluó la influencia de la tasa de carga orgánica y el tiempo de residencia hidráulica en un biorreactor con membranas sumergidas inoculado con lodo anaerobio granular y se observó que la variación de la TCO afectó significativamente a la producción de bio-hidrógeno. Los mayores rendimientos se obtuvieron a cargas orgánicas bajas mientras que las mayores velocidades de producción se obtuvieron a cargas orgánicas altas. La mayor producción de bio-hidrógeno se obtuvo a una TCO de $30 \text{ kg-glucosa m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Al incrementar la TCO hasta niveles de sobrecarga del biorreactor, la ruta metabólica cambió de la producción de ácidos e hidrógeno a la producción de solventes.

Respecto a la evaluación de la influencia del tiempo de residencia hidráulica se notó que la velocidad de producción de bio-hidrógeno fue más sensible a la reducción del TRH que el rendimiento. El mayor rendimiento y la mayor tasa de producción de bio-hidrógeno se obtuvieron a un TRH de 4 h. A pesar de que el uso de un pH bajo inhibió la actividad metanogénica del inóculo, no fue posible controlar su actividad acetogénica. A TRH menores se observó el desarrollo de un proceso acetogénico, el cual resultó en la disminución de la producción de bio-hidrógeno. El principal mecanismo de colmatación de la membrana, durante la variación de la TCO y el TRH, se debió al bloqueo de los poros de la membrana.



A partir del modelado de un sistema teórico de digestión en dos etapas, se determinó que es factible la producción de bio-hitano con una concentración de bio-hidrógeno en la mezcla entre el 5% y 20%, por lo que sería posible su uso en la industria del transporte como combustible con los consecuentes beneficios ambientales, tales como la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero.





REFERENCIAS





1. Abreu AA, Alves JI, Pereira MA, Sousa DZ, Alves MM (2011). Strategies to suppress hydrogen-consuming microorganisms affect macro and micro scale structure and microbiology of granular sludge. *Biotechnol Bioeng*; 108:1766-1775.
2. Akutsu Y, Li Y-Y, Harada H, Yu H-Q (2009). Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch. *Int J Hydrogen Energy*; 34:2558-2566.
3. Al-Malack HM, Anderson GK (1997). Cross flow microfiltration with dynamic membranes. *Water Resour*; 31:1969-1979.
4. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*; 215:403-410
5. Annachhatre AP (1996). Anaerobic Treatment of Industrial Wastewaters. *Resour Conservation Recycling*; 16:161-166.
6. Andreadakis A (1993). Physical and chemical properties of activated sludge floc. *Water Res*; 27:1707-1714.
7. APHA (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. In: Eaton AD, Clesceri AE, Rice EW, Greenberg AE (Eds). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, Washington DC.
8. Appels L, Baeyens J, Degrève J, Dewil R (2008). Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress Energy Comb Sci*; 34:755–781.
9. Argun H, Kargi F, Kapdan IK, Oztekin R (2008). Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *Int J Hydrogen Energy*; 33:1813–1819.
10. Arooj MF, Han S-K, Kim S-H (2007). Sludge characteristics in anaerobic SBR system producing hydrogen gas. *Water Res*; 41:1177-1184.
11. Arooj MF, Han SK, Kim SH, Kim DH, Shin HS (2008). Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. *Int J Hydrogen Energy*; 33:3289–3294.



12. Azbar N, Dokgöz FTC, Keskin T, Korkmaz KS, Syed HM (2009). Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *Int J Hydrogen Energy*; 34:7441-7447.
13. Bartacek J, Zabranska J, Lens PNL (2007). Developments and constraints in fermentative hydrogen production. *Biofuels Bioprod Bioref*; 1:201–214.
14. Bauen A (2006). Future energy sources and systems - Acting on climate change and energy security. *J Power Sour*; 157:893–901.
15. Bedoya A, Castrillón JC, Ramírez JE, Vásquez JE, Zabala MA (2008). Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte. *DYNA*; 75:137-157.
16. Ben Aim RM, Semmens MJ (2002). Membrane bioreactors for wastewater treatment and reuse: a success story. *Water Sci Technol*; 47:1-5.
17. Bernard O, Hadj-Sadok Z, Dochain D, Genovesi A, Steyer J-P (2001). Dynamical model development and parameter identification for an anaerobic wastewater treatment process. *Biotechnol Bioeng*; 75:424-438.
18. Bertin L, Lampis S, Todaro D, Scoma A, Vallini G, Marchetti L, Majone M, Fava F (2010). Anaerobic acidogenic digestion of olive mill wastewaters in biofilm reactors packed with ceramic filters or granular activated carbon. *Water Res*; 44:4537-4549.
19. Beun JJ, Hendriks A, van Loosdrecht MCM, Morgenroth E, Wilderer PA, Heijnen JJ (1999). Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Res*; 33:2283-2290.
20. Bidle KD, Fletcher M (1995). Comparison of free-living and particle-associated bacterial communities in the Chesapeake Bay by stable low-molecular-weight RNA analysis. *Appl Environ Microbiol*; 61:944–952.
21. Bisailon A, Turcot J, Hallenbeck PC (2006). The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. *Int J Hydrogen Energy*; 31:1504–1508.
22. Bohdziewicz J, Neczaj E, Kwarciak A (2008). Landfill leachate treatment by means of anaerobic membrane bioreactor. *Desalination*; 221:559-565.



23. Boonaert CJ-P, Dupont-Gillain CC, Dengis PB, Dufrene YF, Rouxhet PG (1999). Cell separation, flocculation. In: Flickinger MC, Drew JW (Eds.). Encyclopedia of Bioprocess Technology. Wiley, New York.
24. Brockmann M, Seyfried CF (1996). Sludge activity and cross-flow microfiltration: A non-beneficial relationship. Water Sci Technol; 34:205-213.
25. Buitrón G, Carvajal C (2010). Biohydrogen production from tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. Bioresour Technol; 101:9071-9077.
26. Canadian Hydrogen and Fuel Cell Association (2012). Case study. Cars and Buses. Hydrogen and fuel cells are making emissions-free transportation a reality.
27. Carbajal C (2009). Efecto de la Temperatura en la producción de hidrógeno a partir de las aguas residuales. Tesis de maestría – Ingeniería ambiental. Instituto de Ingeniería, UNAM. México.
28. Carrillo-Reyes J, Celis LB, Alatraste-Mondragón F, Razo-Flores E (2012). Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. Int J Hydrogen Energy; 37:5591-5601.
29. Cavinato C, Giuliano A, Bolzonlla D, Pavan P, Cecchi F (2012). Bio-hythane production from food waste by dark fermentation coupled with anaerobic digestion process: A long-term pilot scale experience. Int J Hydrogen Energy; 37:11549-555.
30. Chang F-Y, Lin C-Y (2004). Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. Int J Hydrogen Energy; 29:33-39.
31. Characklis WG (1990). Biofilm processes. In: Characklis WG, Marshall KC (Eds.). Biofilms. Wiley, New York.
32. Charfi A, Amar NB, Hermand J (2012). Analysis of fouling mechanisms in anaerobic membrane bioreactors. Water Res; 46:2637-2650.
33. Chen WM, Tseng ZJ, Lee KS, Chang JS (2005). Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. Int J Hydrogen Energy; 30:1063–1070.



34. Cheng H-H, Whang L-M, Wu C-W, Chung M-C (2012). A two-stage bioprocess for hydrogen and methane production from rice straw bioethanol residues. *Bioresour Technol*; 113:23-29.
35. Cheong D-Y, Hansen CL (2006). Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. *Appl Microbiol Biotechnol*; 72:635-643.
36. Chin HL, Chen ZS, Chou CP (2003). Fedbatch operation using *Clostridium acetobutyricum* suspension culture as biocatalyst for enhancing hydrogen production. *Biotechnol Prog*; 19:383–388.
37. Chu L-B, Yang F-L, Zhang X-W (2005a). Anaerobic treatment of domestic wastewater in a membrane-coupled expanded granular sludge bed (EGSB) reactor under moderate low temperature. *Process Biochem*; 40:1063-1070.
38. Chu L-B, Zhang X-W, Li X, Yang F-L (2005b). Simultaneous removal of organic substances and nitrogen using a membrane bioreactor seeded with anaerobic granular sludge under oxygen-limited conditions. *Desalination*; 172:271-280.
39. Cicek N, Winnen H, Suidan MT, Wrenn BE, Urbain V, Manem J (1998). Effectiveness of the membrane bioreactor in the biodegradation of high molecular weight compounds. *Water Resour*; 32:1553-1563.
40. Collet C, Adler N, Schwitzguebel JP, Peringer P (2004). Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *Int J Hydrogen Energy*; 29:1479–1485.
41. CRYOINFRA (2009). Hoja de datos de seguridad. Hidrógeno.
42. Das D, Veziroglu TN (2001). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int J Hydrogen Energy*; 26:13–28.
43. Das D, Dutta T, Nath K, Kotay SM, Das AK, Veziroglu N (2006). Role of Fe-hydrogenase in biological hydrogen production. *Current Sci*; 90:1627-1637.
44. Das D, Veziroglu TN (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *Int J Hydrogen Energy*; 33:6046–6057.



45. Das LM, Gulati R, Gupta PK (2000). A comparative evaluation of the performance characteristics of a spark ignition engine using hydrogen and compressed natural gas as alternative fuels. *Int J Hydrogen Energy*; 25:783-93.
46. Dávila-Vázquez G, Razo-Flores E (2007). Producción biológica de hidrógeno por vía fermentativa: Fundamentos y perspectivas. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*; 11:19-27.
47. Dávila-Vazquez G, Arriaga S, Alatríste-Mondragón F, de León-Rodríguez A, Rosales-Colunga LM, Razo-Flores E (2008). Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. *Rev Environ Sci Biotechnol*; 7:27-45.
48. De Amorim EL, Sader LT and Silva EL (2012). Effect of substrate concentration on dark fermentation hydrogen production using an anaerobic fluidized bed reactor. *Appl Biochem Biotechnol*; 166:1248-1263.
49. De Beer D, O'Flaherty V, Thaveesri J, Lens P, Verstraete W, de Beer D (1996). Distribution of extracellular polysaccharides and flotation of anaerobic sludge. *Appl Microbiol Biotechnol*; 46:197-201.
50. Defrance L, Jaffrin MY (1999). Comparison between filtrations at fixed transmembrane pressure and fixed permeate flux: application to a membrane bioreactor used for wastewater treatment. *J Membrane Sci*; 152:203-210.
51. DeLong EF, Franks DG, Alldredge AL. (1993) Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnol Oceanogr*; 38:924-934.
52. Dereli RK, Ersahin ME, Ozgun H, Ozturk I, Jeison D, van der Zee F, van Lier JN (2012). Potential of anaerobic membrane bioreactors to overcome treatment limitations induced by industrial wastewaters. *Bioresour Technol*; 122:160-170.
53. Diekert G, Wohlfarth G (1994). Metabolism of homoacetogens. *Antonie van Leeuwenhoek*; 66:209-221.
54. Dinamarca C, Gañán M, Liu J, Bakke R (2011). H₂ consumption by anaerobic non-methanogenic mixed cultures. *Water Sci Technol*; 63:1582-1589.



55. Dinamarca C, Bakke R (2012). Simultaneous hydrogen production and consumption in anaerobic mixed culture fermentation. *Int J Energy Environ*; 3:323-332.
56. Dinopoulou G, Ridd T, Lester JN (1988). Anaerobic acidogenesis of complex wastewater. I. The influence of operational parameters on reactor performance. *Biotechnol Bioeng*; 31:958–968.
57. Dinuccio E, Balsari P, Gioelli F, Menardo S (2010). Evaluation of the biogas productivity potential of some Italian agro-industrial biomasses. *Bioresour Technol*; 101:3780-3783.
58. Dong L, Zhenhong Y, Yongming S, Xiaoying K, Yu Z (2009). Hydrogen production characteristics of organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *Int J Hydrogen Energy*; 34:812–820.
59. Donlan RM, Costerton JW (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*; 15:167–193.
60. Drake HL, Küsel K, Matthies C (2006). Acetogenic Prokaryotes. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (Eds). *The Prokaryotes, Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry*. Springer-Verlag. New-York, pp. 354-420.
61. Drews A, Kraume M (2002). Influence of continuous membrane bioreactor operation on ferrichrome production using *Ustilago maydis*. *Desalination*; 149:261-266.
62. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substrates. *Anal Chem*; 28:350-356.
63. Eriksson L, Steen I, Tendaj M (2001). Evaluation of sludge properties at an activated sludge plant. *Water Sci Technol*; 25:251-265.
64. Fabiano B, Perego P (2002). Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *Int. J. Hydrogen Energy*; 27:149–156.
65. Fang HHP, Chui HK, Li YY (1994). Microbial structure and activity of UASB granules treating different wastewaters. *Water Sci Technol*; 30:87-96.



66. Fang HHP, Liu H (2002a). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresour Technol*; 82:87-93.
67. Fang HHP, Liu H, Zhang T (2002b). Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnol Bioeng*; 78:44-52.
68. Fond O, Petitdemange E, Petitdemange H, Gay R (1984). Effect of glucose flow on the acetone butanol fermentation in fed batch culture. *Biotechnol Lett*; 6:13-18.
69. Gaffron H, Rubin J (1942). Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *J. Gen Physiol*; 26:219–240.
70. Gander M, Jefferson B, Judd S (2000). Aerobic MBRs for domestic wastewater treatment: a review with cost considerations. *Sep Purification Technol*; 18:119-130.
71. Garrity G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume Two: The Proteobacteria (Part C)*. 2nd ed. New York: Springer, 2005.
72. Gavala HN, Skiadas IV, Ahring BK (2006). Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. *Int J Hydrogen Energy*; 31:1164–1175.
73. González-Fernández C, Sialve B, Bernet N, Steyer JP (2012). Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass Bioenergy*; 40:105-111.
74. Gjermansen M, Ragas P, Sternberg C, Molin S, Tolker-Nielsen T (2005). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ Microbiol*; 7:894–904.
75. Gottwald M, Gottschalk G (1985). The internal pH of *Clostridium acetobutyricum* and its effect on the shift from acid to solvent formation. *Arch Microbiol*; 143:42-46.
76. Grossart H-P, Simon M. (1998) Bacterial colonization and microbial decomposition of limnetic organic aggregates (lake snow). *Aquat Microb Ecol*; 15:127–140.
77. Grupe H, Gottschalk G (1992). Physiological events in *Clostridium acetobutyricum* during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction. *Appl Environ Microbiol*; 58:3896-3902.



78. Guo L, Li XM, Bo X, Yang Q, Zeng GM, Liao DX, Liu J-J (2008a). Impacts of sterilization, microwave and ultrasonication pretreatment on hydrogen producing using waste sludge. *Bioresour Technol*; 99:3651–3658.
79. Guo W-Q, Ren N-Q, Wang X-J, Xiang W-S, Meng Z-H, Ding J, Qu Y-Y, Zhang L-S (2008b). Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *Int J Hydrogen Energy*; 33:4981–4988.
80. Gutekunst K, Hoffmann D, Lommer M, Egert M, Suzuki I, Schulz-Friedrich R, Appel J (2006). Metal dependence and intracellular regulation of the bidirectional NiFe-hydrogenase in *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Int J Hydrogen Energy*; 31:1452–1459.
81. Hafez H, Nakhla G, Naggat MHE, Elbeshbishy E, Baghchehsaraee B (2010). Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *Int J Hydrogen Energy*; 35:81–92.
82. Hai FI, Yamamoto K (2011). *Membrane biological reactors*. Elsevier B.V. Netherlands.
83. Hallenbeck PC, Benemann JR (2002). Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrogen Energy*; 27:1185–1193.
84. Hallenbeck PC (2005). Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Sci Technol*; 52:21-29.
85. Hawkes F, Dinsdale R, Hawkes D, Hussy I (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. *Int J Hydrogen Energy*; 27:1339-1347.
86. Hawkes F, Hussy I, Kyazze G, Dinsdale R, Hawkes D (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *Int J Hydrogen Energy*; 32:172-174.
87. Horn MA, Matthies C, Küsel K, Schramm A, Drake HL (2003). Hydrogenotrophic methanogenesis by moderately acid-tolerant methanogens of a methane-emitting acidic peat. *Appl Environ Microbiol*; 69:74–83.
88. Hu AY, Stuckey DC (2006). Treatment of dilute wastewater using a novel submerged anaerobic membrane bioreactor. *J Environ Eng*; 132:190-198.



89. Hu B, Chen SL (2007). Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *Int J Hydrogen Energy*; 32:3266–3273.
90. Hu B, Chen S (2008). Biological hydrogen production using chloroform-treated methanogenic granules. *Appl Biochem Biotechnol*; 148:83-95.
91. Hung C-H, Chang Y-T, Chang Y-J (2011). Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems – A review. *Bioresour Technol*; 102:8437-8444.
92. IPCC (2011). IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation. In: Edenhofer O, Pichs-Madruga R, Sokona Y, Seyboth K, Matschoss P, Kadner S, Zwickel T, Eickemeier P, Hansen G, Schlömer S, von Stechow C (Eds). Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
93. Jackson DD, Ellms JW (1896). On odors and tastes of surface waters with special reference to *Anabaena*, a microscopical organism found in certain water supplies of Massachusetts. *Rep Mass State Board Health*; 410–420.
94. Jame R, Vilímová V, Lakatoš B, Varečka L (2011). The hydrogen production by anaerobic bacteria grown on glucose and glycerol. *Acta Chimica Slovaca*; 4:145 – 157.
95. Jeison D (2007). Anaerobic membrane bioreactors for wastewater treatment: feasibility and potential applications. Ph. D. Thesis, Wageningen University. Wageningen, The Netherlands.
96. Jeison D, van Lier JB (2007). Cake formation and consolidation: Main factors governing the applicable flux in anaerobic submerged membrane bioreactors (AnMBR) treating acidified wastewaters. *Sep Purification Technol*; 56:71-78.
97. Jeison D, Plugge CM, Pereira A, van Lier JB (2009). Effects of acidogenic biomass on the performance of an anaerobic membrane bioreactor for wastewater treatment. *Bioresour Technol*; 100:1951-1956.



98. Jeong T-Y, Cha G-C, Yoo I-K, Kim D-J (2007). Hydrogen production from waste activated sludge by using separation membrane acid fermentation reactor and photosynthetic reactor. *Int J Hydrogen Energy*; 32:525-530.
99. Jeong E, Kim H-W, Nam J-Y, Shin H-S (2010). Enhancement of bioenergy production and effluent quality by integrating optimized acidification with submerged anaerobic membrane bioreactor. *Bioresour Technol*; 101:S7-S12.
100. Jo JH, Lee DS, Park D, Choe W-S, Park JM (2008). Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods. *Bioresour Technol*; 99:2061-2066.
101. Judd S (2008). The status of membrane bioreactor technology. *Trends Biotechnol*; 26:109-116.
102. Jung K-W, Kim D-H, Kim S-H, Shin H-S (2011). Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresour Technol*; 102:8612-8620.
103. Jungermann K, Thauer RK, Leimenstoll G, Decker K (1973). Function of reduced pyridine Nucleotide-Ferredoxin Oxidoreductases in saccharolytic *Clostridia*. *Biochim Biophys Acta*; 305:268-280.
104. Khanal SK, Chen W-H, Li L, Sung S (2004). Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *Int J Hydrogen Energy*; 29:1123–1131.
105. Khanal SK (2008). Overview of anaerobic biotechnology. In: *Anaerobic biotechnology for bioenergy production. Principles and applications*. Wiley-Blackwell (Eds). Ames, Iowa, USA.
106. Kim IS, Hwang MH, Jang NJ, Hyun SH, Lee ST (2004). Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process. *Int J Hydrogen Energy*; 29:1133-1140.
107. Kim SH, Han SK, Shin HS (2006a). Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochem*; 41:199–207.



108. Kim DH, Han SK, Kim SH, Shin HS (2006b). Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy*; 31:2158–2169.
109. Kim M-S, Oh Y-K, Yun Y-S, Lee D-Y (2006c). Fermentative hydrogen production from anaerobic bacteria using a membrane bioreactor. 16th WHEC, 13-16 June. Lyon, France.
110. Kim D-H, Kim S-H, Ko I-B, Lee C-Y, Shin H-S (2008). Start-up strategy for continuous fermentative hydrogen production: Early switchover from batch to continuous operation. *Int J Hydrogen Energy*; 33:1532-1541.
111. Kim M-S, Lee D-Y, Kim D-H (2011). Continuous hydrogen production from tofu processing waste using anaerobic mixed microflora under thermophilic conditions. *Int J Hydrogen Energy*; 36:8712-8718.
112. Kim SH, Shin HS (2008). Effects of base-pretreatment on continuous enriched culture for hydrogen production from food waste. *Int J Hydrogen Energy*; 33:5266–5274.
113. Kim T-H, Lee Y, Chang K-H, Hwang S-J (2012). Effects of initial lactic acid concentration, HRTs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. *Bioresour Technol*; 103:136-141.
114. Kim BH, Zeikus JG (1985). Importance of hydrogen metabolism in regulation of solventogenesis by *Clostridium acetobutyricum*. *Dev Ind Microbiol*; 26:549-556.
115. Kirchman D, Mitchell R (1982). Contribution of particle-bound bacteria to total microheterotrophic activity in five ponds and two marshes. *Appl Environ Microbiol*; 43:200-209.
116. Koros WJ, Ma YH, Shimizu T (1996). Terminology for membranes and membrane processes. *J Membr Sci*; 120:149-159.
117. Kotay SM, Das D (2007). Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge. *Bioresour Technol*; 98:1183-1190.



118. Kotsopoulos TA, Zeng RJ, Angelidaki I (2006). Biohydrogen production in granular up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors with mixed cultures under hyper-thermophilic temperature (70 °C). *Biotechnol Bioeng*; 94:296-302.
119. Kovács K, Kovács A, Maroti G, Bagi Z, Csana G, Perekatalin I, Balint B, Balogh J, Fulop A, Meszaros L, Toth A, David R, Latinovics D, Varga A, Rakhely G (2004). Improvement of biohydrogen production and intensification of biogas formation. *Rev Environ Sci Biotech*; 3:321–330.
120. Kovács K, Maróti G, Rákhely G (2006). A novel approach for biohydrogen production. *Int J Hydrogen Energy*; 31:1460-1468.
121. Kraemer JT, Bagley DM (2007). Improving the yield from fermentative hydrogen production. *Biotechnol Lett*; 29:685–95.
122. Kraemer JT, Bagley DM (2008). Measurement of H₂ consumption and its role in continuous fermentative hydrogen production. *Water Sci Technol*; 57:681-685.
123. Kryvoruchko V, Machmuller A, Bodiroza V, Amon B, Amon T (2009). Anaerobic digestion of by-products of sugar beet and starch potato processing. *Biomass Bioenergy*; 33:620-627.
124. Kumar N, Das D (2000). Production and purification of alpha-amylase from hydrogen producing *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Bioprocess Eng*; 23:205-208.
125. Kumar N, Das D (2001). Continuous hydrogen production by immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices. *Enzyme Microbiol Technol*; 29:280–287.
126. Kyazze G, Martinez-Perez N, Dinsdale R, Premier GC, Hawkes FR, Guwy AJ, Hawkes DL (2006). Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production. *Biotechnol Bioeng*; 93:971-979.
127. Lee JM, Ahn WY, Lee CH (2001a). Comparison of the filtration characteristics between attached and suspended growth microorganisms in submerged membrane bioreactor. *Water Resour*; 35:2435-2445.



128. Lee YJ, Miyahara T, Noike T (2001b). Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. *Bioresour Technol*; 80:227–231.
129. Lee YJ, Miyahara T, Noike T (2002). Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. *J Chem Technol Biotechnol*; 77: 694–698.
130. Lee KS, Lo YS, Lo YC, Lin PJ, Chang JS (2004). Operation strategies for biohydrogen production with a high-rate anaerobic granular sludge bed bioreactor. *Enzyme Microbiol Technol*; 35:605–612.
131. Lee HS, Chung J, Rittmann BE. Comment on “Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge”. *Int J Hydrogen Energy* 2006; 31:1797–1798.
132. Lee K-S, Lo Y-C, Lin P-J, Chang J-S (2006). Improving biohydrogen production in a carrier-induced granular sludge bed by altering physical configuration and agitation pattern of the bioreactor. *Int J Hydrogen Energy*; 31:1648–1657.
133. Lee KS, Lin PJ, Fangchiang K, Chang JS (2007). Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor. *Int J Hydrogen Energy*; 32:950–957.
134. Lee D-Y, Li Y-Y, Noike T, Cha G-C (2008a). Behavior of extracellular polymers and biofouling during hydrogen fermentation with a membrane bioreactor. *J Membrane Sci*; 322:13-18.
135. Lee KS, Hsu YF, Lo YC, Lin PJ, Lin CY, Chang JS (2008b). Exploring optimal environmental factors for fermentative hydrogen production from starch using mixed anaerobic microflora. *Int J Hydrogen Energy*; 33:1565–1572.
136. Lee H-S, Salerno MB, Rittmann BE (2008c). Thermodynamic evaluation on H₂ production in glucose fermentation. *Environ Sci Technol*; 42:2401–2407.
137. Lee D-Y, Li Y-Y, Noike T (2009a). Continuous H₂ production by anaerobic mixed microflora in membrane bioreactor. *Bioresour Technol*; 100:690-695.



138. Lee D-Y, Li Y-Y, Oh Y-K, Kim M-S, Noike T (2009b). Effect of iron concentration on continuous H₂ production using membrane bioreactor. *Int J Hydrogen Energy*; 34:1244-1252.
139. Lee D-Y, Li Y-Y, Noike T (2010). Influence of solids retention time on continuous H₂ production using membrane biorreactor. *Int J Hydrogen Energy*; 335: 52-60.
140. Leite JAC, Fernandes BS, Pozzi E, Barboza M, Zaiat M (2008). Application of an anaerobic packed-bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. *Int J Hydrogen Energy*; 33:579– 586.
141. Lettinga G, van Velsen AFM, Hobma SW, de Zeeuw W, Klapwijk A (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol Bioeng*; 22:699-734.
142. Levin DB, Pitt L, Love M (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int J Hydrogen Energy*; 29:173–185.
143. Levin DB, Islam R, Cicek N, Sparling R (2006). Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *Process Biochem*; 31:1496–1503.
144. Li X, Gao F, Hua Z, Du G, Chen J (2005). Treatment of synthetic wastewater by a novel MBR with granular sludge developed for controlling membrane fouling. *Sep Purification Technol*; 46:19-25.
145. Li CL, Fang HHP (2007a). Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Crit Rev Env Sci Technol*; 37:1–39.
146. Li CL, Fang HHP (2007b). Inhibition of heavy metals on fermentative hydrogen production by granular sludge. *Chemosphere*; 67:668–673.
147. Li X, Li Y, Liu H, Hua Z, Du G, Chen J (2007c). Characteristics of aerobic biogranules from membrane biorreactor system. *J Membr Sci*; 287:294-299.



148. Li X-F, Li Y-J, Liu H, Hua Z-Z, Du G-C, Chen J (2008). Correlation between extracellular polymeric substances and aerobic biogranulation in membrane biorreactor. *Sep Purification Technol*; 59:26–33.
149. Liang T-M, Cheng S-S, Wu K-L (2002). Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane. *Int J Hydrogen Energy*; 27:1157-1165.
150. Liang D-W, Shayegan SS, Ng WJ, He J (2010). Development and characteristics of rapidly formed hydrogen-producing granules in an acidic anaerobic sequencing batch reactor (AnSBR). *Biochem Eng J*; 49:119-125.
151. Liao B-Q, Kraemer JT, Bagley DM (2006). Anaerobic membrane bioreactors: Applications and research directions. *Crit Rev Env Sci Technol*; 36:489-530.
152. Lim AL, Bai R (2003). Membrane fouling and cleaning in microfiltration of activated sludge wastewater. *J Membr Sci*; 216:279-290.
153. Lin C-Y, Jo C-H (2003). Hydrogen production from sucrose using an anaerobic sequencing batch reactor process. *J Chem Technol Biotechnol*; 78:678-684.
154. Lin C-Y, Lay C-H (2004). Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *Int J Hydrogen Energy*; 29:41-45.
155. Lin C-Y, Lay CH (2004b). Effects of carbonate and phosphate concentration on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *Int J Hydrogen Energy*; 29:275-281.
156. Lin C-Y, Chang R-C (2004). Fermentative hydrogen production at ambient temperature. *Int J Hydrogen Energy*; 29:715-720.
157. Lin C-Y, Hung C-H, Chen C-H, Chung W-T, Cheng L-H (2006). Effects of initial cultivation pH on fermentative hydrogen production from xylose using natural mixed cultures. *Process Biochem*; 41:1383–1390.
158. Liu H, Fang HHP (2002). Hydrogen production from wastewater by acidogenic granular sludge. *Water Sci Technol*; 47:153-158.



159. Lobato J, Cañizares P, Rodrigo MA, Sáez C, Linares JJ (2006). A comparison of hydrogen cloud explosion models and the study of the vulnerability of the damage caused by an explosion of H₂. *Int J Hydrogen Energy*; 31:1780–90.
160. Logan BE (2008). *Microbial Fuel cells*. Ed. Wiley-Interscience. 213 p.
161. Loubette N, Junker M (2006). State of the art of biological hydrogen production processes. 16th WHEC, 13-16 June 2006 – Lyon France.
162. Lowry OH, Rosenbrough NH, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem*; 193:265-275.
163. Luo Y, Zhang H, Salerno M, Logan BE, Bruns MA (2008). Organic loading rates affect composition of soil-derived bacterial communities during continuous, fermentative biohydrogen production. *Int J Hydrogen Energy*; 33:6566–6576.
164. Luo G, Karakashev D, Xie L, Zhou Q, Angelidaki I (2011). Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: Homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. *Biotechnol Bioeng*; 108:1816-1827.
165. Lynd LH, Zeikus JG (1983). Metabolism of H₂-CO₂, methanol, and glucose by *Butyribacterium methylotrophicum*. *J Bacteriology*; 153:1415-1423.
166. MacLeod FA, Guiot SR, Costerton JW (1990). Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Appl Environ Microbiol*; 56:1598-1607.
167. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (2009). *Brock Biology of Microorganisms*, twelfth ed. Person Education, San Francisco, CA.
168. Mandal B, Nath K, Das D (2006). Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnol Lett*; 28:831–835.
169. Marchi S, Somerday BP (2010). Technical reference on hydrogen compatibility of materials. Nonmetals: Polymers (code 8100). Sandia National Laboratories, Livermore CA.



170. McCarty PL, Mosey FE (1991). Modeling of anaerobic digestion processes (a discussion of concepts). *Water Sci Technol*; 24:17–33.
171. Melis A, Melnicki MR (2006). Integrated biological hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy*; 31:1563–1573.
172. Meng F, Chae SR, Drews A, Kraume M, Shin HS, Yang F (2009). Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): Membrane fouling and membrane material. *Water Research*; 43:1489-1512.
173. Menniti A, Kang S, Elimelech M, Morgenroth E (2009). Influence of shear on the production of extracellular polymeric substances in membrane bioreactors. *Water Res*; 43:4305–4315.
174. Middha P, Engel D, Hansen OR (2011). Can the addition of hydrogen to natural gas reduce the explosion risk? *Int J Hydrogen Energy*; 36:2628–2636.
175. Mikkelsen LH, Keiding K (1999). Equilibrium aspects of the effects of shear and solids content on aggregate deflocculation. *Adv Colloid Interface Sci*; 80:151–182.
176. Mohan SV, Babu VL, Sarma PN (2007). Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor (AnSBR): Effect of organic loading rate. *Enzyme Microb Technol*; 41:506-515.
177. Mohan SV (2008). Fermentative hydrogen production with simultaneous wastewater treatment: influence of pretreatment and system operating conditions. *J Sci Ind Res*; 67:950-961.
178. Mohan SV, Babu VL, Sarma PN (2008). Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresour Technol*; 99:59–67.
179. Montes-Moncivais A, Moreno G, Buitrón G (2007). Influence of inoculum source, pH and temperature on hydrogen production. 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion, 23-27 September, Brisbane Australia.



180. Morgan-Sagastume F, Allen DG (2004). Flocculation in natural and engineered environmental systems. In: Droppo IG, Leppard GG, Liss SN, Milligan TG (Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL.
181. Morgan-Sagastume F, Larsen P, Nielsen JL, Nielsen PH (2008). Characterization of the loosely attached fraction of activated sludge bacteria. *Water Res*; 42:843–854.
182. Mu Y, Yu H-Q (2006). Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. I: Physicochemical characteristics of hydrogen-producing granules. *Biotechnol Bioeng*; 94:980-987.
183. Mu Y, Yu H-Q, Wang Y (2006). The role of pH in the fermentative H₂ production from an acidogenic granule-based reactor. *Chemosphere*; 64:350-358.
184. Muyzer G, Teske A, Wirsén CO, Jannasch HW (1995). Phylogenetic relationship of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol*; 164:165-172.
185. Namkung E, Rittmann BE (1986). Soluble microbial products (Smp) formation kinetics by biofilms. *Water Res*; 20:795–806.
186. Nath K, Das D (2004). Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Appl Microbiol Biotechnol*; 65:520-529.
187. Nath K, Das D (2005). Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* strain O.U. 001 using spent media of *Enterobacter cloacae* strain DM11. *Appl Microbiol Biotechnol*; 68:533–541.
188. Ng WJ, Ong SL, Tan KY, Hu JY, Lee LY, Song LF (2002). Toxicity assays to determine the start-up strategy for an anaerobic sequencing batch reactor (anSBR). *Water Sci Technol*; 46:343-348.
189. Ng HY, Hermanowicz SW (2005). Membrane bioreactor operation at short solids retention times: performance and biomass characteristics. *Water Res*; 39:981-992.



190. Nicolella C, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ (2000). Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *J Biotechnol*; 80:1-33.
191. Ogino H, Miura T, Ishimi K, Seki M, Yoshida H (2005). Hydrogen production from glucose by anaerobes. *Biotechnol Prog*; 21:1786–1788.
192. Oh Y-K, Seol E-H, Lee E, Park S (2002). Fermentative hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* P4. *Int J Hydrogen Energy*; 27:1373-1379.
193. Oh S-E, Iyer P, Bruns MA, Logan BE (2004). Biological hydrogen production using a membrane bioreactor. *Biotechnol Bioeng*; 87:119-127.
194. Ong SL, Hu JY, Ng WJ, Lu ZR (2002). Granulation enhancement in anaerobic sequencing batch reactor operation. *J Environ Eng*; 128:387-390.
195. Orecchini F, Naso V (2012). *Energy Systems in the Era of Energy Vectors, Green Energy and Technology*, Springer-Verlag, London.
196. Oren A (2010). *Microbial Metabolism: Importance for Environmental Biotechnology*. In: Wang LK, Ivanov V, Tay J-H (Eds). *Environmental Biotechnology*. Humana Press, New York, pp 193-255.
197. O-Thong S, Prasertsan P, Intrasungkha N, Dhamwichukorn S, Birkeland NK (2008). Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge. *Int J Hydrogen Energy*; 33:1221–1231.
198. Park W, Hyun SH, Oh SE, Logan BE, Kim IS (2005). Removal of headspace CO₂ increases biological hydrogen production. *Environ Sci Technol*; 39:4416–4420.
199. Pemex (2000). Hoja de datos de seguridad. Gas Natural.
200. Pendyala B, Chaganti SR, Lalman JA, Shanmugam SR, Heath DD, Lau PCK (2012). Pretreating mixed anaerobic communities from different sources: Correlating the hydrogen yield with hydrogenase activity and microbial diversity. *Int J Hydrogen Energy*; 37:12175-12186.



201. Peters J W, Lanzilotta WN, Lemon BJ, Seefeldt LC (1998). X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridia pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science*; 282:1853-1858.
202. Pol LW, de Castro SI, Lettinga G, Lens PNL (2004). Anaerobic sludge granulation. *Water Resour*; 38:1376-1389.
203. Psoch C, Schiewer S (2006). Resistances analysis for enhanced wastewater membrane filtration. *J Membr Sci*; 280:284-297.
204. Rachman MA, Nakashimada Y, Kakizono T, Nishio N (1998). Hydrogen production with high yield and high evolution rate by self-flocculated cells of *Enterobacter aerogenes* in a packed-bed reactor. *Appl Microbiol Biotechnol*; 49:450-454.
205. Ramachandran R, Menon RK (1998). An overview of industrial uses of hydrogen. *Int J Hydrogen Energy*; 23:593-598.
206. Reith J, Wijffels R, Barteb H (2003). Bio-methane & Bio-hydrogen: Status and perspectives of biological methane and hydrogen production. Dutch Biological hydrogen Foundation. The Netherlands. 1665 p.
207. Ren N, Xing D, Rittmann, BE, Zhao L, Xie T, Zhao X (2007). Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environ Microbiol*; 9:1112-1125.
208. Rifkin J (2002). La economía del hidrógeno. La creación de la red energética mundial y la redistribución del poder en la tierra. Editorial Paidós. Barcelona, España.
209. Roychowdhury S, Cox D, Levandowsky M (1988). Production of hydrogen by microbial fermentation. *Int J Hydrogen Energy*; 13:407-410.
210. Sarada R, Joseph R (1996). A comparative study of single and two stage processes for methane production from tomato processing waste. *Process Biochem*; 31:337-340.
211. Schmidt JE, Ahring BK (1994). Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Appl Microbiol Biotechnol*; 42:457-462.



212. Schmidt JE, Ahring BK (1999). Immobilization patterns and dynamics of acetate-utilizing methanogens immobilized in sterile granular sludge in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Appl Environ Microbiol*; 65:1050-1054.
213. Scoma A, Bertin L, Zanaroli G, Fraraccio S, Fava F (2011). A physicochemical-biotechnological approach for the integrated valorization of an agroindustrial waste. *Bioresour Technology*; 102:10273-10279.
214. Scoma A, Bertin L, Fava F (2013). Effect of hydraulic retention time on biohydrogen and volatile fatty acids production during acidogenic digestion of dephenolized olive mill wastewaters. *Biomass Bioenergy*; 48:51-58.
215. Seghezzi L, Zeeman G, van Lier JB, Hamelers HVM, Lettinga G (1998). A review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresour Technol*; 65:175-190.
216. Seo GT, Jan SW, Lee HS, Yoon CH (2005). The fouling characterization and control in the high concentration PAC Membrane Bioreactor HCPAC-MBR. *Water Sci Technol*; 51:77-84.
217. Shen L, Bagley DM, Liss SN (2009). Effect of organic loading rate on fermentative hydrogen production from continuous stirred tank and membrane bioreactors. *Int J Hydrogen Energy*; 34:3689-3696.
218. Shen L, Zhou Y, Mahendran B, Bagley DM, Liss SN (2010). Membrane fouling in a fermentative hydrogen producing membrane bioreactor at different organic loading rates. *J Membr Sci*; 360:226-233.
219. Shin H S, Youn JH, Kim SH (2004). Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int J Hydrogen Energy*; 29:1355–1363.
220. Shizas I, Bagley DM (2005). Fermentative hydrogen production in a system using anaerobic digester sludge without heat treatment as a biomass source. *Water Sci Technol*; 52:139-144.



-
221. Show KY, Zhang ZP, Lee DJ (2008). Design of bioreactors for biohydrogen production. *J Sci Ind Res*; 67:941-949.
222. Simon MA, Alldredge L, Azam F (1990). Bacterial carbon dynamics on marine snow. *Mar Ecol Prog Ser*; 65:205-211.
223. Simon M, Grossart H-P, Schweitzer B, Ploug H (2002). Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquat Microb Ecol*; 28:175–211.
224. Sinha P, Pandey A (2011). An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *Int J Hydrogen Energy*; 36:7460–7478.
225. Smith DC, Steward GF, Long RA, Azam F (1995). Bacterial mediation of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm. *Deep-Sea Res II*; 42:75-97.
226. Stephenson M, Strickland LH (1931). Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen, I. The properties of the enzyme. *Biochem J*; 25:205-214.
227. Strickland LH (1929). The bacterial decomposition of formate. *Biochem J*; 23:1187.
228. Suresh S, Tripathi RK, Rana G (2011). Review on treatment of industrial wastewater using sequential batch reactor. *Int J Sci Technol Management*; 2:64-84.
229. Suthaker S, Polprasert C, Droste RL (1991). Sequencing batch anaerobic reactors for treatment of high-strength organic wastewater. *Water Sci Technol*; 23:1249-1257.
230. Switzenbaum MS, Giraldo-Gomez E, Hickey RF (1990). Monitoring of the anaerobic methane fermentation process. *Enzyme Microb Technol*; 12:722–30.
231. Taconi KA, Zappi ME, French WT, Brown LR (2007). Feasibility of methanogenic digestion applied to a low pH acetic acid solution. *Bioresour Technol*; 98:1579-1585.
232. Taconi KA, Zappi ME, French WT, Brown LR (2008). Methanogenesis under acidic pH conditions in a semi-continuous reactor system. *Bioresour Technol*; 99:8075-8081.
233. Taguchi F, Mizukami N, Saito-Taki T, Hasegawa K (1995). Hydrogen production from continuous fermentation of xylose during growth of *Clostridium sp.* strain no. 2. *Can J Microbiol*; 41:536 – 540.



234. Taguchi F, Yamada K, Hasegawa K, Taki-Saito T, Hara K (1996). Continuous hydrogen production by *Clostridium sp.* strain no. 2 from cellulose hydrolysate in an aqueous two-phase system. *J Ferment Bioeng*; 82:80–83.
235. Tanisho S, Wakao N, Kokako Y (1983). Biological hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *J Chem Eng Jpn*; 16:529-530.
236. Tanisho S, Suzuki Y, Wakao N (1987). Fermentative hydrogen evolution by *Enterobacter aerogenes* strain E.82005. *Int J Hydrogen Energy*; 12:623-627.
237. Tanisho S, Kuromoto M, Kadokura N (1998). Effect of CO₂ removal on hydrogen production by fermentation. *Int J Hydrogen Energy*; 23:559 – 563.
238. Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel HD (2003). *Wastewater engineering: treatment and reuse*. Metcalf & Eddy Inc., fourth ed. McGraw Hill, New York.
239. Terracciano JS, Kashket ER (1986). Intracellular conditions required for initiation of solvent production by *Clostridium acetobutyricum*. *Appl Environ Microbiol*; 52:86-91.
240. Turcot J, Bisailon A, Hallenbeck PC (2008). Hydrogen production by continuous cultures of *Escherchia coli* under different nutrient regimes. *Int J Hydrogen Energy*; 33:1465–1470.
241. Ueno Y, Otsuka S, Morimoto M (1996). Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture. *J Ferm Bioeng*; 82:194-197.
242. Valdez-Vazquez I, Poggi-Varaldo HM (2009a). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renew Sustain Energy Rev*; 13:1000–1013.
243. Valdez-Vazquez I, Poggi-Varaldo HM (2009b). Alkalinity and high total solids affecting H₂ production from organic solid waste by anaerobic consortia. *Int J Hydrogen Energy*; 34:3639–3646.
244. Vallero MVG, Lettinga G, Lens PNL (2005). High rate sulfate reduction in a submerged anaerobic membrane bioreactor (SAMBaR) at high salinity. *J Membrane Sci*; 253:217-232.



245. Van Ginkel S, Sung S, Lay JJ (2001). Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environ Sci Technol*; 35:4726–4730.
246. Van Ginkel S, Logan B (2005a). Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. *Environ Sci Technol*; 39:9351-9356.
247. Van Ginkel S, Logan B (2005b). Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Res*; 39:3819–3826.
248. Vargas A, Moreno JC, Mendoza I (2009). Development of an Automated Anaerobic Biodegradability Testing Device. *Instrum Sci Tech*; 37:40-49.
249. Villante C, Genovese A (2012). Hydromethane: A bridge towards the hydrogen economy or an unsustainable promise? *Int J Hydrogen Energy*; 37:11541-48.
250. Wang CC, Chang CW, Chu CP, Lee DJ, Chang BV, Liao CS (2003a). Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. *J Biotechnol*; 102:83–92.
251. Wang L, Zhou Q, Li FT (2006a). Avoiding propionic acid accumulation in the anaerobic process for biohydrogen production. *Biomass Bioenergy*; 30:177–182.
252. Wang CH, Lin PJ, Chang JS (2006b). Fermentative conversion of sucrose and pineapple waste into hydrogen gas in phosphate-buffered culture seeded with municipal sewage sludge. *Process Biochem*; 41:1353–1358.
253. Wang B, Wan W, Wang J (2008). Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy*; 33:7013–7019.
254. Wang JL, Wan W (2008a). Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing cultures from digested sludge. *Int J Hydrogen Energy*; 33:2934–2941.
255. Wang JL, Wan W (2008b). Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *Int J Hydrogen Energy*; 33:5392–5397.



256. Wang JL, Wan W (2008c). Effect of Fe^{2+} concentrations on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *Int J Hydrogen Energy*; 33:1215–1220.
257. Wang JL, Wan W (2008d). Influence of Ni^{2+} concentration on biohydrogen production. *Bioresour Technol*; 99:8864–8868.
258. Wang J, Wan W (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Int J Hydrogen Energy*; 34:799–811.
259. Wang Y-Y, Ai P, Hu C-X, Zhang Y-L (2011). Effects of various pretreatment methods of anaerobic mixed microflora on biohydrogen production and the fermentation pathway of glucose. *Int J Hydrogen Energy*; 36:390-396.
260. Weiland P (2010). Biogas production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*; 85:849–860.
261. Widdel F, Pfennig N (1982). Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov. *Arch Microbiol*; 131:360–365.
262. Wilén B-M, Keiding K, Nielsen PH (2000a). Anaerobic deflocculation and aerobic reflocculation of activated sludge. *Water Res*; 34:3933–3942.
263. Wilén B-M, Nielsen JL, Keiding K, Nielsen PH (2000b). Influence of microbial activity on the stability of activated sludge flocs. *Colloids Surf. B*; 18:145–156.
264. Wilén B-M, Jin B, Lant P (2003). Impacts of structural characteristics on activated sludge floc stability. *Water Res*; 37:3632–3645.
265. Won SG, Lau AK (2011). Effects of key operational parameters on biohydrogen production via anaerobic fermentation in a sequencing batch reactor. *Bioresour Technol*; 102:6876-6883.
266. Wu JH, Lin CY (2004). Biohydrogen production by mesophilic fermentation of food wastewater. *Water Sci Technol*; 49:223–228.



267. Wu SY, Hung CH, Lin CN, Chen HW, Lee AS, Chang JS (2006). Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge. *Biotechnol Bioeng*; 93:934-936.
268. Wu S-Y, Hung C-H, Lin C-Y, Lin P-J, Lee K-S, Lin C-N, Chang F-Y, Chang J-S (2008). HRT-dependent hydrogen production and bacterial community structure of mixed anaerobic microflora in suspended, granular and immobilized sludge systems using glucose as the carbon substrate. *Int J Hydrogen Energy*; 33:1542–1549.
269. Yang J-K, Choi K-M, Lee S-T, Mori T (1997). Effects of hydraulic retention time on the anaerobic digestion of thickened excess sludge by sulfite in the two phase digester. *Environ Eng Res*; 2:191-200.
270. Yang W, Cicek N, Ilg J (2006). State-of-the-art of membrane bioreactors: Worldwide research and commercial applications in North America. *J Membrane Sci*; 270:201-211.
271. Ye D, Quensen III JF, Tiedje JM, Boyd SA (1999). 2-Bromoethanesulfonate, sulfate, molybdate, and ethanesulfonate inhibit anaerobic dechlorination of polychlorobiphenyls by pasteurised microorganisms. *Appl Environ Microbiol*; 65:327-329.
272. Yokoi H, Ohkawara T, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y (1995). Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. *J Ferment Bioeng*; 80:571–574.
273. Yu HQ, Zhu ZH, Hu WR, Zhang HS (2002). Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *Int J Hydrogen Energy*; 27:1359–1365.
274. Zajic JE, Kosaric N, Brosseau JD (1978). Microbial production of hydrogen. *Adv Biochem Eng*; 7:57–109.
275. Zhang H, Bruns MA, Logan BE (2006a). Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutyricum* in an unsaturated flow reactor. *Water Res*; 40:728–734.



-
276. Zhang ZP, Show KY, Tay JH, Liang DT, Lee DJ, Jiang WJ (2006b). Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochem*; 41:2118–2123.
 277. Zhang Z-P, Tay J-H, Show K-Y, Yan R, Liang DT, Lee D-J, Jiang W-J (2007a). Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. *Int J Hydrogen Energy*; 32:185–191.
 278. Zhang ZP, Show KY, Tay JH, Liang DT, Lee DJ, Jiang WJ (2007b). Rapid formation of hydrogen-producing granules in an anaerobic continuous stirred tank reactor induced by acid incubation. *Biotechnol Bioeng*; 96:1040–1050.
 279. Zhang L, Feng X, Zhu N, Chen J (2007c). Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. *Enzyme Microbial Technol*; 41:551-55.
 280. Zhang Z-P, Adav SS, Show K-Y, Tay J-H, Liang DT, Lee D-J, Su A (2008). Characteristics of rapidly formed hydrogen-producing granules and biofilms. *Biotechnol Bioeng*; 101:926-936.
 281. Zhao QB, Yu HQ (2008). Fermentative H₂ production in an upflow anaerobic sludge blanket reactor at various pH values. *Bioresour Technol*; 99:1353–1358.
 282. Zhou X, Ren N (2007). Acid resistance of methanogenic bacteria in a two-stage anaerobic process treating high concentration methanol wastewater. *Front Environ Sci Engin China*; 1:53-56.
 283. Zhu HG, Beland M (2006). Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *Int J Hydrogen Energy*; 31:1980–1988.
 284. Zigova J, Sturdik E (2000). Advances in biotechnological production of butyric acid. *J Ind Microbiol Biotechnol*; 24:153–60.
 285. Züttel A, Borgschulte A, Schlapbach L (2008). Hydrogen as a future energy carrier. Wiley-VCH. Germany. 427 p.





**PUBLICACIONES DERIVADAS
DEL PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN
DOCTORAL**





PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES INDIZADAS

1. Hernández-Mendoza CE, Buitrón G (2013). Suppression of methanogenic activity in anaerobic granular biomass for hydrogen production. *Int J Chem Technol Biotechnol*. Doi: 10.1002/jctb.4143
2. Hernández-Mendoza CE, Buitrón G. Effect of the organic loading rate on hydrogen production in a granular sludge membrane bioreactor. *Sometido*, *Bioresource Technology*.
3. Hernández-Mendoza CE, Moreno-Andrade I, Buitrón G. Comparison of bacterial communities producing hydrogen on continuous and discontinuous reactors. *Sometido*, *International Journal of Hydrogen Energy*.
4. Hernández-Mendoza CE, Moreno-Andrade I, Buitrón G. Influence of the biomass settleability on bio-hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor. En preparación.
5. Hernández-Mendoza CE, Buitrón G. Effect of the hydraulic retention time on hydrogen production in a granular based membrane bioreactor. En preparación.
6. Hernández-Mendoza CE, Buitrón G. Influence of the organic loading rate and hydraulic retention time on the membrane resistances during bio-hydrogen production. En preparación.

PUBLICACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES

1. Hernández-Mendoza CE, Buitrón G (2010). Fermentative hydrogen production on membrane bioreactors: A mini review. 12th IWA Specialist Conference on Anaerobic Digestion. *Poster presentation*. 31 de octubre al 4 de noviembre. Guadalajara, México.
2. Hernández-Mendoza CE, Moreno-Andrade I, Buitrón G (2011). Evaluation of settleable and non-settleable microorganisms during bio-hydrogen production. *Microbes in Wastewater and Waste Treatment, Bioremediation and Energy Production*. *Platform presentation*. January, 24-26. Goa, India.



3. Hernández-Mendoza CE, Buitrón G (2011). Effect of hydraulic retention time on hydrogen production in a granular sludge-based anaerobic sequencing batch reactor. X Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion (DAAL). *Poster presentation*. October, 23-27. Ouro Preto, Brasil.
4. Hernández-Mendoza CE, Moreno-Andrade I, Buitrón G (2012). Comparison of two start-up strategies for hydrogen production with granular anaerobic sludge. IWA World Congress on Water, Climate and Energy. *Platform presentation*. May, 13-18. Dublin, Irlanda.
5. Hernández-Mendoza CE, Buitrón G (2012). Bio-hydrogen production at different organic loading rates in a membrane bioreactor inoculated with granular sludge. IWA World Congress on Water, Climate and Energy. *Poster presentation*. May, 13-18. Dublin, Irlanda.
6. Hernández-Mendoza CE, Buitrón, G (2013). Enhancing the hydrogen production through the organic loading rate and the hydraulic retention time. 13th World Congress on Anaerobic Digestion. *Platform presentation*. June, 25-28. Santiago de Compostela, España.
7. Moreno-Andrade I, Hernández-Mendoza CE, Buitrón G (2013). Comparison of bacterial communities producing hydrogen on continuous and discontinuous reactors. 5th. World Hydrogen Technology Conference. *Platform presentation*. September, 25-28. Shangai, China.

PUBLICACIONES EN CONGRESOS NACIONALES

1. Hernández-Mendoza CE, Moreno-Andrade I, Buitrón G (2010). Influence of biomass stratification on bio-hydrogen production in an anaerobic sequential batch reactor using a mixed culture. 2nd IWA Mexico Young Water Professionals Conference. *Platform presentation*. 12-14 de Abril. Querétaro, México.
2. Hernández-Mendoza CE, Buitrón G (2010). Efecto del pH inicial en la producción de bio-hidrógeno empleando un consorcio bacteriano sin tratamiento previo. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. *Cartel*. 19-24 de Junio. Querétaro, México.



3. Hernández-Mendoza CE, Buitrón G (2013). Increasing the hydrogen production through the hydraulic retention time in a membrane biorreactor. IWA-Mexico Young Water Professionals. *Platform presentation*. 24-26 de Abril. San Luis Potosí, México.
4. Hernández-Mendoza CE, Latrille E, Buitrón G (2013). Predicting the hydrogen content in the biohythane production in a two-stage anaerobic system. IWA-Mexico Young Water Professionals. *Platform presentation*. 24-26 de Abril. San Luis Potosí, México.