

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN REGIMEN BATCH CON
AGUA RESIDUAL PROVENIENTE DE LA INDUSTRIA CERVECERA.

ERIKA FERNANDA ARIAS GONZÁLEZ.
CINDY LORENA RODRÍGUEZ BOHÓRQUEZ.

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA.
FACULTAD DE INGENIERÍA.
PROGRAMA DE INGENIERÍA CIVIL.
BOGOTÁ D.C.
2012

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN REGIMEN BATCH CON
AGUA RESIDUAL PROVENIENTE DE LA INDUSTRIA CERVECERA.

ERIKA FERNANDA ARIAS GONZÁLEZ.
CINDY LORENA RODRÍGUEZ BOHÓRQUEZ.

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniero Civil

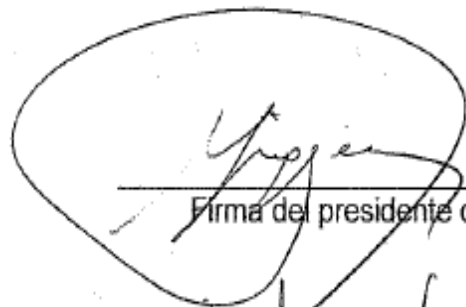
Director
Sergio Andrés Blanco Londoño - Esp.
Ingeniero Civil

Co- Director
Adela Tatiana Rodríguez Chaparro – Ph.D
Ingeniera Civil

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA.
FACULTAD DE INGENIERÍA.
PROGRAMA DE INGENIERÍA CIVIL.
BOGOTÁ D.C.
2012

Nota de aceptación:

El trabajo de grado, Estudio de la producción de hidrógeno en regimen Batch con agua residual proveniente de la industria cervecera, ha sido revisado y aprobado por:



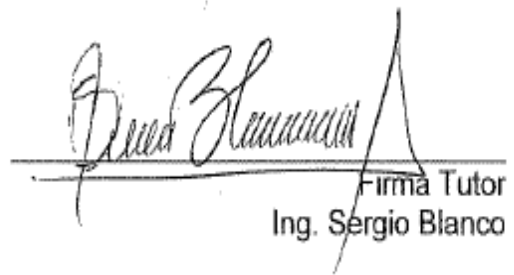
A handwritten signature in black ink, enclosed within a hand-drawn oval shape. The signature is cursive and appears to be 'Yegor'.

Firma del presidente del Comité



A handwritten signature in black ink, consisting of several vertical strokes and horizontal lines, appearing to be 'H. H. H.'.

Firma del jurado



A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Sergio Blanco'.

Firma Tutor
Ing. Sergio Blanco

Bogotá D.C. 26 de Noviembre de 2012

DEDICATORIA

*A Dios por guiarnos y acompañarnos,
A nuestras familias y seres queridos
motivo de inspiración y dedicación
en cada uno de nuestros pasos,
quienes nos apoyaron y alentaron
a dar culminación a una etapa
de nuestras vidas.*

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos:

A la Universidad Militar Nueva Granada por su apoyo financiero y talento humano, quienes por su preocupación constante buscan nuevos avances en la educación con calidad.

A nuestros maestros y mentores Sergio Blanco y Tatiana Rodríguez por la dedicación en la elaboración de este trabajo.

A todos los docentes y laboratoristas pertenecientes a tan benemérita institución educativa, quienes nos apoyaron durante nuestro proceso de formación, brindándonos sus conocimientos y experiencias en particular a los ing. Giovanni González, Ing. Aurora Velasco, Ing. Luis Pinzón, Ing. Jorge Corredor, Ing. Oscar Reyes, Ing. Darío Munera, Ing. Luz Morales, y el Ing. Jesús Ramos.

Al grupo de investigación de tratamiento de aguas por su valioso aporte a este estudio y cada una de las personas que lo integran por su apoyo continuo.

A todos los compañeros que estuvieron acompañándonos durante estos 5 años quienes nos brindaron nuevas experiencias día a día.

A nuestros grandes amigos y colegas Viviana Otálora, Karen Pedraza, Lina Fernández, Yeison Garzón, Juan Pérez, Fabian Echeverry, Camilo Narvaez y David Mojica con quienes conformamos una amistad de por vida.

A nuestras familias quienes siempre nos brindaron una palabra de aliento para seguir adelante en este proceso y generaron una motivación permanente para no desfallecer en ningún momento, guiándonos en cada paso con cariño, apoyo y confianza desde el inicio de nuestras vidas.

TABLA DE CONTENIDO

| | Pág |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 12 |
| | |
| 1. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN REGIMEN BATCH CON AGUA RESIDUAL PROVENIENTE DE LA INDUSTRIA CERVECERA. | 13 |
| 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 13 |
| 1.2. JUSTIFICACIÓN..... | 13 |
| 1.3. OBJETIVOS..... | 14 |
| 1.3.1. Objetivo general..... | 14 |
| 1.3.2. Objetivos específicos | 14 |
| | |
| 2. REVISION BIBLIOGRÁFICA. | 15 |
| 2.1. GENERALIDADES | 15 |
| 2.1.1. Procesos químicos..... | 15 |
| 2.1.2. Procesos físicos..... | 15 |
| 2.1.3. Procesos biológicos..... | 16 |
| 2.2. PROCESOS ANAEROBIOS..... | 22 |
| 2.2.1. Bioquímica o microbiología de la digestión anaerobia | 24 |
| 2.3. FERMENTACIÓN OSCURA | 27 |
| 2.3.1. Principales principios de la producción de hidrógeno via fermentación oscura..... | 27 |
| 2.3.2. Rendimientos según tipos de fermentación | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.3. Bacterias fermentativas..... | 30 |
| 2.4 PARÁMETROS DE INFLUENCIA EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO... | 35 |
| 2.5. CONDICIONES AMBIENTALES | 38 |
| 2.5.1. Nutrientes y elementos traza | 38 |
| 2.5.2. Toxicidad..... | 39 |
| 2.6. TÉCNICAS PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO. | 40 |
| 2.7. METODOLOGÍAS DE MEDICIÓN DE GASES..... | 43 |
| | |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 44 |
| | |
| 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS | 53 |
| 4.1. PRIMERA ETAPA DEL EXPERIMENTO | 53 |
| 4.2. SEGUNDA ETAPA DEL EXPERIMENTO..... | 55 |
| | |
| 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS. | 59 |
| 5.1. CONCLUSIONES | 59 |
| 5.2. PERSPECTIVAS | 59 |
| | |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 61 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Procesos de digestión anaerobia y puntos de generación y consumo de hidrógeno. | 25 |
| Figura 2. Montaje 1. | 44 |
| Figura 3. Figura esquemática del reactor en bachelada. | 45 |
| Figura 4. Montaje experimental 1. | 50 |
| Figura 5. Montaje experimental 2. | 51 |
| Figura 6. pH, Montaje 1. | 54 |
| Figura 7. DQO, Montaje 1. | 54 |
| Figura 8. AVT, Montaje 1. | 55 |
| Figura 9. pH, Montaje 2. | 56 |
| Figura 10. DQO, Montaje 2. | 57 |
| Figura 11. AVT, Montaje 2. | 58 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Cultivos mixtos estudiados para la producción fermentativa de hidrógeno. | 32 |
| Tabla 2. Cultivos puros estudiados para la producción fermentativa de hidrógeno. | 34 |
| Tabla 3. Síntesis de procesos para la cuantificación de producción de H ₂ | 43 |
| Tabla 4. Características del agua residual de Bavaria..... | 47 |
| Tabla 5. Composición de nutrientes utilizados. | 49 |
| Tabla 6. Parámetros evaluados..... | 52 |

RESUMEN

El crecimiento poblacional y el excesivo consumo de combustibles exponen de manera inmediata una necesidad en busca de posibles alternativas para la producción y uso de nuevas energías como lo es el hidrogeno, de manera sostenible con el fin de brindar un mejor futuro a las nuevas generaciones. Para tal fin, a nivel mundial se han venido desarrollando diferentes metodologías y avances en este campo, que implican un gran avance científico.

La utilización del hidrógeno puede ser una de las alternativas energéticas al petróleo que permita sortear los problemas ambientales que plantea el actual uso de combustibles fósiles, que es insostenible. Es por esto que con este trabajo se pretende desarrollar una metodología en régimen Batch para la producción de hidrogeno a partir del tratamiento anaerobio de las aguas residuales de la industria cervecera.

Para poder cumplir con los objetivos de este proyecto, se realizó inicialmente una revisión de la literatura que comprende el periodo de 2003 a 2005 con el fin de tener diferente información y de esta manera seleccionar las mejores referencias, desde el punto de vista técnico y económico. Posteriormente se realizó un montaje experimental que consistió en aplicar la metodología de la fermentación oscura del agua residual de la industria cervecera.

Se realizaron dos experimentos, en el primero se utilizó como sustrato el agua residual de Bavaria y agua sintética así como un inóculo proveniente del lodo del reactor UASB de dicha empresa y en el segundo se utilizó los mismos sustratos e inóculo aumentando su concentración. Los resultados mostraron que hubo un mejor comportamiento en el experimento 2, debido principalmente a la fermentación de un volumen reaccional mayor en comparación con el montaje 1. Estos valores se comprobaron con los ensayos de DQO y AVT cuyos resultados presentaron una disminución y un aumento respectivamente en cada ensayo durante los 17 días de operación. De lo anterior se puede decir que la metodología empleada en el experimento 2 es más efectiva para comenzar a explorar el estudio de la producción de hidrogeno a partir de aguas residuales de la Industria Cervecera utilizando fermentación oscura.

ABSTRACT

Population growth and excessive fuel consumption immediately exposed a need for possible alternatives for the production and use of new energy sources such as hydrogen, in a sustainable way in order to provide a better future for the new generations. For this reason, all around the world have been developing different methodologies and advances in this field, involving a scientific breakthrough.

The use of hydrogen can be one of energy alternatives to oil that allows to circumvent the environmental problems posed by the current use of fossil fuels, is unsustainable. That is why this work is to develop a methodology in batch system for hydrogen production from anaerobic treatment of wastewater from the brewing industry.

To achieve the objectives of this project, initially a literature review was made covering the period from 2003 to 2005 in order to have different information and thus select the best references, from the standpoint of technical and economic. Later an experimental mounting was performed which consisted of applying the methodology of the dark fermentation of waste water from the brewing industry.

The results showed higher performance in assembling number 2, where a higher volume was fermented reaction compared assembly number 1, which was proved by tests AVT COD and the results showed a decrease and increase respectively in each test during 17 days of operation also achieved a better control of the influential parameters in the process, making this a viable methodology for the production of hydrogen from the dark fermentation.

INTRODUCCIÓN

El hidrógeno se ha venido posicionando como una alternativa viable, demostrando grandes ventajas, ya que es limpio, renovable, presenta un alto contenido energético, se puede acumular, no genera impacto ambiental y lo que más llama la atención, es la posibilidad de reutilizar desechos orgánicos, que se presentan en un buen porcentaje en las aguas residuales.

Este documento, presenta una revisión de la literatura sobre la producción de hidrógeno y adicionalmente se quiere dar a conocer un análisis experimental, basado en una de las más eficientes metodologías para la producción de hidrógeno, como lo es la fermentación oscura, buscando las condiciones óptimas para su buen desarrollo.

1. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN REGIMEN BATCH CON AGUA RESIDUAL PROVENIENTE DE LA INDUSTRIA CERVECERA.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por medio de diferentes estudios realizados desde varios años atrás, se han conocido diversas metodologías para la producción de bio-hidrógeno.

En este proyecto se empleó una metodología ya establecida para la producción de hidrógeno, utilizando aguas residuales, en específico las de la industria cervecera. Esta industria ocupa uno de los renglones más importantes en la economía del país por tanto; recuperar un subproducto en la degradación de las aguas residuales, representaría un aporte importante para este sector, así como para la Ingeniería Sanitaria. Con base en esto, el problema que se pretende resolver es:

¿Es posible producir hidrogeno a partir del tratamiento anaerobio de aguas residuales de la industria cervecera?

1.2. JUSTIFICACIÓN

Frente a toda la problemática de energética a nivel mundial y a la necesidad de buscar una solución, actualmente se vienen desarrollando diferentes procesos experimentales en busca de un desarrollo óptimo en la generación de hidrógeno a partir de la utilización de diversas aguas residuales. Por tal motivo se pretende por medio de una metodología que se basa en la fermentación de oscura de agua residual de la industria cervecera, determinar las condiciones más viables para producir hidrógeno.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

Realizar un análisis experimental en reactores en régimen Batch para determinar la producción de hidrógeno con agua residual de la industria cervecera.

1.3.2. Objetivos específicos

Realizar una revisión bibliográfica de la producción de hidrógeno en el periodo 2003- 2005.

Determinar por medio de los valores de DQO y AVT la producción indirecta de hidrogeno utilizando inculo sin previa adaptación.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. GENERALIDADES

Los estudios de generación de hidrógeno se han enfocado principalmente en la búsqueda de diferentes tecnologías que maximicen los rendimientos de producción, explorando las condiciones de operación óptimas para el desarrollo del mismo.

En la revisión se categoriza la información en cuatro grupos que se describen a continuación.

2.1.1. Procesos químicos

Este proceso puede ser empleado mediante dos métodos. El primero de ello es usando molibdeno el cual se basa en la implementación de un catalizador que contiene molibdeno que al entrar en contacto con el agua genera varias reacciones encadenadas que separan de manera sencilla las moléculas de agua en hidrógeno y oxígeno. Este proceso tiene como ventaja que es económico (Anukard's Weblog, 2012).

El segundo es mediante la implementación de boro, el cual en contacto con el agua puede crear hidrógeno en forma gaseosa. Teniendo como ventaja la reutilización del mismo ya que tras su uso (para crear energía mecánica para el vehículo) vuelve a emitir boro que puede utilizarse de nuevo, con el fin de ir generando un ciclo (Anukard's Weblog, 2012).

2.1.2. Procesos físicos

Este proceso está basado en la implementación de la electrólisis del agua, la cual ha sido hasta ahora la única técnica comercializable para producir hidrógeno a partir de combustibles no fósiles. El principal desafío que enfrenta esta tecnología es la selección de materiales que posibiliten la producción de hidrógeno

económica y eficaz. El material más estudiado es el níquel, sus aleaciones y compuestos, ya que muestra una buena actividad electro-catalítica, durabilidad aceptable y bajo precio. Los esfuerzos actuales están dirigidos a mejorar el desempeño de los electrodos de base Ni, y para ello es necesario mantener una alta actividad catalítica a la reacción de evolución de H₂, aumentando la superficie específica, logrando una alta hidrofiliidad de la superficie para facilitar el desprendimiento de las burbujas de gas generadas (Stoklusa *et al*, 2012). Su desventaja es el alto requerimiento de electricidad lo cual es un poco costoso.

2.1.3. Procesos biológicos

El biohidrógeno denominado de esta manera debido a su obtención por medio de procesos biológicos puede ser producido mediante la utilización de diferentes bacterias provenientes principalmente de sedimentos y lodos (aerobios o anaerobios). Por ende los procesos biológicos han sido utilizados desde hace tiempo para el tratamiento de aguas residuales. Estos se pueden dividir, de acuerdo al aceptor final de electrones involucrado en la vía metabólica de los microorganismos, en dos procesos: procesos aerobios, en los cuales el oxígeno es el principal aceptor de electrones y los anaerobios que funcionan en ausencia de oxígeno. (Gujer & Zenhder, 1983).

Así mismo los procesos de producción de hidrógeno biológico se pueden clasificar en tres categorías principales: Biofotólisis (empleando algas y cianobacterias), foto fermentación (descomposición de compuestos orgánicos por bacterias fotosintéticas) y fermentación oscura (producción de hidrógeno fermentativo por medio de la descomposición de materia orgánica), (Hallenbeck & Ghosh, 2009), los cuales serán referidos de manera breve a continuación.

A. Biofotólisis: También puede ser llamada foto-disociación biológica del agua, el cual se refiere a la conversión de agua y energía solar a hidrógeno y oxígeno usando microorganismos, comúnmente microalgas y/o cianobacterias.

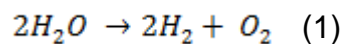
El hidrógeno se puede producir a través de la absorción directa de la luz y la transferencia de electrones a las enzimas hidrogenasa y/o nitrogenasa. Bajo condiciones anaerobias o de excesiva energía, los excesos de electrones son liberados por los microorganismos empleando la enzima hidrogenasa la cual convierte los iones hidrogenasa a gas hidrógeno. Los protones y electrones extraídos a través de las reacciones de división de agua son combinados por cloroplastos hidrogenasa para formar gas hidrógeno molecular.

En los procesos de división se produce también oxígeno, para prevenir la acumulación de oxígeno, se ha investigado en identificar algas y bacterias menos sensitivas al oxígeno (Show *et al*, 2011)

Este método puede ser clasificado de la siguiente manera:

- **Biofotólisis directa:**

Éste es un proceso de producción de hidrógeno y oxígeno fotosintéticamente a partir de agua y luz solar (Ecuación. 1). En él se usan algunos microorganismos que constituyen las algas verdes, las cuales requieren de un tiempo de incubación anaerobia en oscuridad para inducir la síntesis o la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo del hidrógeno, como las hidrogenasas reversibles e irreversibles (Daday, Platz, & Smith, 2007), (Melis & Happe, 2001), (Weissman & Benemann, 1977). Éstas canalizan la producción de dos protones (2H⁺) a hidrógeno gaseoso (H₂) mediante la siguiente reacción (Jorquera , Hernández , & Herrera , 2003), (Levin , Pitt, & Love , 2004).



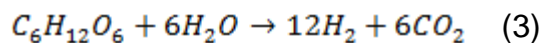
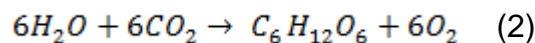
Teniendo en cuenta que la hidrogenasa en este proceso no es tolerante al oxígeno y que el proceso genera los dos gases en forma simultánea (hidrógeno y oxígeno), no es viable a lo largo del tiempo, sino se hacen

ciertas modificaciones. (Bedoya, Castrillón, Ramirez, Vásquez, & Arias, 2008).

Este presenta como ventajas la utilización de sustratos con abundante agua y productos simples, aunque como desventaja tiene una eficiencia baja en conversión de luz, una sensibilidad de la enzima hidrogenasa frente al oxígeno y un valor alto en su implementación. (Sinha & Anjana, 2011), (Aispuro Castro, 2011).

- **Biotólisis indirecta:**

Se lleva a cabo por cianobacterias y algas verde-azules, donde a partir del proceso fotosintético el CO_2 es fijado a sustratos ricos en hidrógeno endógeno generando luego hidrógeno molecular cuando estos microorganismos se incuban en condiciones anaerobias (Dutta, De, Chauduri, & Bhattacharya, 2005).



En el proceso se requiere un sistema de cultivo inicial para la fotosíntesis normal y otro sistema aparte para la generación de hidrógeno (Kovács, Maróti, & Rákhely, 2006). Las cianobacterias poseen varias enzimas involucradas directamente en el metabolismo del hidrógeno. La más importante, la nitrogenasa, cataliza la producción de hidrógeno en el proceso de fijación del nitrógeno. Otra enzima es la hidrogenasa captadora, la cual oxida el hidrógeno que sintetiza la nitrogenasa y, por último, están las hidrogenasas bidireccionales que tienen la habilidad de oxidar y sintetizar hidrógeno.

La producción de hidrógeno por cianobacterias ha sido estudiada por cerca de tres décadas y se ha revelado que la eficiente fotoconversión de agua en hidrógeno es influenciada por muchos factores, siendo la intensidad de luz el más importante (Bedoya, Castrillón, Ramirez, Vásquez, & Arias, 2008).

Presenta como ventaja la habilidad de fijar el nitrógeno de la atmosfera y como desventaja las hidrogenasas consumidoras de hidrógeno deben ser removidas para detener la degradación de hidrógeno (Aispuro Castro, 2011).

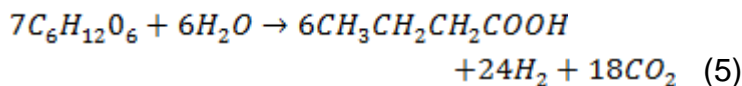
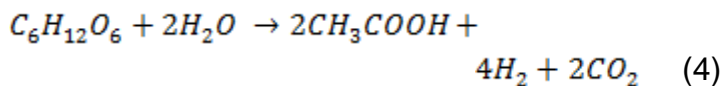
B. Fotofermentación: Utiliza bacterias púrpuras no sulfurosas que producen hidrógeno, catalizado por la nitrogenasa bajo condiciones deficientes en N_2 , usando luz y compuestos reducidos, como ácidos orgánicos, que muchas veces están contenidos en sustancias de desecho. (Bedoya, Castrillón, Ramirez, Vásquez, & Arias, 2008).

En este proceso también interviene la hidrogenasa captadora de hidrógeno, la cual compite por el hidrógeno disponible en el medio, reduciendo la actividad de la nitrogenasa al quedar sin sustrato. Uno de los parámetros que más afectan la fotofermentación es la intensidad de luz, pues un incremento en ésta se ha visto que afecta de forma simultánea la velocidad de producción y el rendimiento del hidrógeno (Hillmer & Gest, 1977), (Reith, Wijffels, & Barten, 2003), (Kapdan & Kargi, 2006), (Bedoya, Castrillón, Ramirez, Vásquez, & Arias, 2008).

Se han evaluado configuraciones tubulares, de panel de platos y de columna de burbujeo, obteniéndose diferentes resultados en la producción de hidrógeno, debido a las diferencias en la agitación e intensidad de la luz, parámetros cruciales para este método de producción (Reith, Wijffels, & Barten, 2003), (Kapdan & Kargi, 2006), (Bedoya, Castrillón, Ramirez, Vásquez, & Arias, 2008).

Este método presenta como ventaja la conversión completa de diferentes residuos de ácidos orgánicos a H₂ y CO₂, y como desventajas la baja eficiencia en la conversión de luz presente entre el 1 y 5%, alta demanda de energía por la enzima nitrogenasa, el caldo fermentado necesita ser tratado para su disposición (Pallavi & Pandey, 2011), (Vaceque Acosta, Villalba , & Yuruhan Cabello , 2010), (Aispuro Castro, 2011)

C. Fermentación oscura: La producción de hidrógeno por este método está dada por bacterias anaerobias que crecen en oscuridad y usan sustratos ricos en carbohidratos. Los subproductos de la fermentación lo constituyen los ácidos acético (máximo teórico de 4 mol H₂/mol glucosa) y butírico (máximo teórico de 3.4 mol H₂/mol glucosa), con lo que los rendimientos prácticos de hidrógeno en la fermentación oscura están alrededor de 2 mol H₂/mol glucosa (Levin , Pitt, & Love , 2004)



Las fermentaciones se llevan a cabo a diferentes temperaturas, desde mesófilicas (25-40 °C), hasta termófilicas (>50 °C), (Zhang , Liu, & Fang , 2003), (Lin & Chang, 2004), produciéndose biogás que contiene H₂, CO₂, CO, H₂S y, en alguno casos, CH₄. Las especies bacterianas que producen hidrógeno por este sistema, y que son más conocidas, son las que corresponden a los géneros *Enterobacter*, *Bacillus* y *Clostridium* (Reith, Wijffels, & Barten, 2003) (Levin , Pitt, & Love , 2004).

La producción de hidrógeno por estas bacterias depende de condiciones del proceso como pH, tiempo de retención hidráulica (HRT) y presión parcial del gas. La formación de los productos obedece a las condiciones ambientales en las

cuales los microorganismos crecen. Productos como etanol, butanol y lactato, contienen hidrógeno que todavía no se ha liberado; así, para maximizar la cantidad de hidrógeno, el metabolismo de la bacteria debe enfocarse hacia la producción de ácidos grasos volátiles (VFA) (Chen , Tseng , Lee , & chang , 2005), (Lee, Lin , & Chang , 2006) (Lin & Chen, 2006) (Bedoya, Castrillón, Ramirez, Vásquez, & Arias, 2008).

Presenta como ventajas el no requerimiento de luz solar produciendo más hidrógeno ya que no depende del todo de ella, la utilización de reactores de simple operación y un adecuado manejo de residuos, a su vez es un proceso anaerobio por lo que no tiene problemas de limitación de oxígeno. Como desventajas esta la baja producción de hidrógeno, y la generación de una gran cantidad de productos secundarios (Sinha & Anjana, 2011), (Vaceque Acosta, Villalba , & Yuruhan Cabello , 2010).

Algunos estudios se han enfocado en la producción de biohidrógeno por fermentación, usando cepas puras anaerobias o una mezcla de ellas (Lay, 2000), dado que muchos organismos anaerobios pueden producir hidrógeno en ausencia de la luz, a partir de los carbohidratos contenidos en los residuos orgánicos (Kapdan & Kargi, 2006), que a su vez genera una mayor velocidad de producción de hidrogeno debido a que se encuentran condicionadas para optimizar dicha obtención.

Generalmente los cultivos bacterianos (inóculo) utilizados en la producción de hidrógeno son sometidos a diferentes pre-tratamientos con el fin de seleccionar a las bacterias generadoras de hidrógeno, alterando la comunidad microbiana presente en la población inicial (Cheong y Hasen, 2006). Siendo significativo que los organismos pertenecientes al género *Clostridium*, estrictamente anaerobios y formadores de esporas, han sido ampliamente estudiados para la producción fermentativa de hidrógeno, con muy buenos resultados (Buitrón & Carvajal, 2009), dichas esporas son seleccionadas de los ambientes naturales por tratamiento térmico o sometidas a condiciones ácidas (bajos pH).

Cuando los cultivos mixtos son utilizados como inóculo, las especies predominantes en el reactor dependen de las condiciones de operación como temperatura, pH, sustrato, tipo de inóculo, pretratamiento del inóculo, presión parcial de hidrógeno, entre otros. En los últimos años, varias investigaciones se han llevado a cabo para identificar la comunidad microbiana presente en los cultivos mixtos, usados para la producción de hidrógeno. Fang *et al.*, (2002), identificaron las especies microbianas en un lodo granular para la producción de hidrógeno, a partir de sacarosa. Ellos encontraron que el 69 % de los microorganismos eran especies *Clostridium* y 13.5% eran especies *Bacillus* y *Staphylococcus*. (Buitrón & Carvajal, 2009)

Sin embargo, los rendimientos de la transformación de la materia orgánica a H₂, durante la etapa de fermentación pueden ser bajos (Hallenbeck y Beneman, 2002), por lo cual es necesario desarrollar más investigación en el tema, con el fin de ampliar el potencial para sus aplicaciones prácticas.

2.2. PROCESOS ANAEROBIOS.

Recientemente, se ha observado que existe la posibilidad de emplear los procesos anaerobios para la producción de hidrógeno, sin llegar a la transformación del sustrato a metano (Hallenbeck, 2005). El principal interés en el uso del hidrógeno es que este combustible no contribuye a la generación de gases de efecto invernadero, pues, como subproducto de su combustión, sólo se genera agua. Además, tiene un alto poder calorífico (120 MJ/kg). Por ejemplo, el valor energético de un kilogramo de hidrógeno es equivalente al de 2.4 kg de metano o 2.75 veces más energía que los hidrocarburos. Si bien es cierto que la materia orgánica procedente de aguas residuales, es probablemente insuficiente para sostener una economía global basada en el hidrógeno. Esta forma de producción de energía renovable podría ayudar a compensar de forma sustancial los costos del tratamiento de las aguas residuales (sobre todo aquéllas con muy altas concentraciones en materia orgánica) así como a contribuir en el aprovechamiento del hidrógeno como fuente de energía (Buitrón & Carvajal, 2009).

El proceso de tratamiento anaerobio es en la mayoría de veces ideal para el tratamiento del agua residual y es casi seguro el incremento de su uso en el futuro. Entre las principales ventajas de emplear procesos anaerobios en el tratamiento biológico de aguas residuales, están los bajos costos de operación porque es simple técnicamente y el uso de los reactores es relativamente económico, bajo consumo de energía ya que en lugar de ser consumida, la energía es producida en forma de biogas, la capacidad de degradar altas cargas orgánicas, resistencia de la biomasa a permanecer mucho tiempo en ausencia de sustrato, sin perder su actividad metabólica, puede ser aplicado en prácticamente en cualquier lugar y a cualquier escala, el exceso de lodos generalmente es bien estabilizado los organismos anaerobios pueden ser preservados sin alimentar por largos periodos de tiempo (superior a un año) sin un serio deterioro de su actividad mientras otras características importantes de los lodos anaerobios permanecen casi inafectados debido a sus bajos requerimientos nutricionales. A su vez la digestión anaerobia puede no proveer un completo tratamiento si no se resuelve los siguientes problemas: 1. La relativa susceptibilidad de acetógenos y metanogenos a variar en compuestos xenobioticos. A pesar de esto, la situación es mucho menos que en el pasado, 2. La presumida baja estabilidad del tratamiento anaerobio, aunque en realidad los procesos de digestión anaerobia son altamente estables, siempre que el sistema este bien operado. Esto quiere decir que el proceso debe ser suficientemente comprendido por ingenieros y operadores, 3. No se puede realizar más de una puesta en marcha. Se sabe un poco más de las condiciones de crecimiento de los organismos anaerobios, y se disponen de más cantidades de lodos anaerobios activos, por lo tanto la puesta en marcha de instalaciones completas pueden ser realizadas en unas semana, algunos incluso en pocos días, (Lettinga , 1995), generando como principales desventajas los bajos rendimientos obtenidos en relación con el proceso de fotosíntesis y el gas producido que se encuentra mezclado con el CO₂, por lo que requiere una posterior separación para ser utilizado (Peixoto G. , 2008).

(Gujer & Zenhder, 1983) propusieron seis etapas bajo las cuales se lleva a cabo la degradación anaerobia: hidrólisis de proteínas y carbohidratos; fermentación de azúcares y aminoácidos; oxidación anaerobia de los ácidos grasos de cadena larga y alcoholes; oxidación anaerobia de intermediarios como ácidos grasos volátiles; conversión de acetato a metano, y conversión de hidrógeno a metano, aunque vale la pena mencionar que en los procesos anaerobios tradicionales, el

hidrógeno se produce a través de la hidrólisis de la materia orgánica; sin embargo, éste se utiliza inmediatamente por los microorganismos consumidores de hidrógeno, tales como los formadores de metano y las bacterias sulfato-reductoras. Por lo tanto, la cantidad de hidrógeno presente en la fase gaseosa es insignificante. No obstante, en ausencia o debido a la inhibición de las bacterias consumidoras de hidrógeno, la cantidad de H₂ formada bajo condiciones apropiadas se puede incrementar significativamente. Por ejemplo, (Fang H & Liu , 2002), reportaron un porcentaje de H₂ formado en la fase gas de hasta 60%.

2.2.1. Bioquímica o microbiología de la digestión anaerobia

La digestión anaerobia representa un sistema ecológico delicadamente balanceado, el cual involucra procesos metabólicos complejos, que dependen de actividades de no mínimo tres grupos fisiológicos de microorganismos: 1. Bacterias fermentativas (o acidogénicas), 2. Bacterias sintróficas (o acetogénicas) y 3. Los microorganismos metanogénicos (Chernicharo, 2007).

Las bacterias fermentativas acidogénicas convierten por hidrólisis y fermentación, los compuestos (carbohidratos, proteínas y lípidos) en otros compuestos más simples, principalmente ácidos orgánicos, a la vez de hidrógeno y dióxido de carbono. Los organismos sintroficos acetogénicos convierten los compuestos orgánicos intermedios como propionato y butirato, en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono. Después, el acetato y el hidrogeno producidos en las etapas anteriores son convertidos en metano y dióxido de carbono. Esta conversión es efectuada por un grupo especial de microorganismos, denominados arqueas metanogénicas las cuales son procariotas estrictamente anaerobias. Los organismos metanogénicos dependen del sustrato proporcionado por las bacterias formadoras de ácidos, configurando por lo tanto una interacción sintrófica. (Chernicharo, 2007).

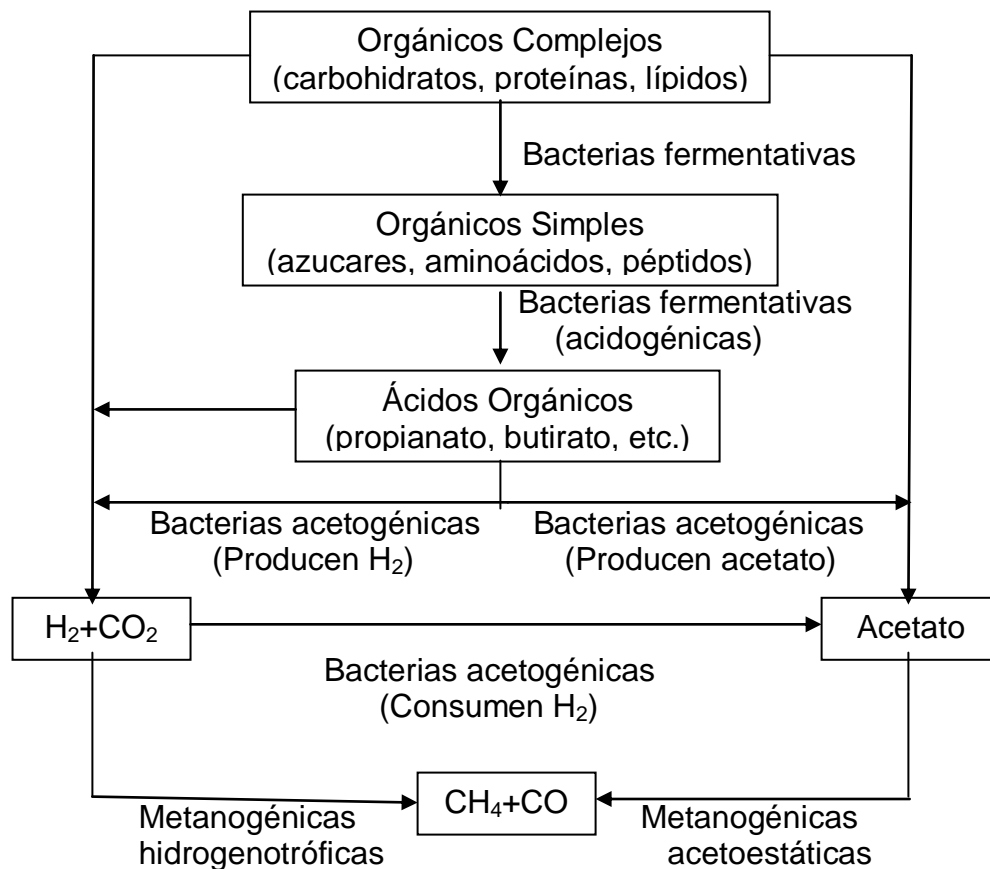


Figura 1. Procesos de digestión anaerobia y puntos de generación y consumo de hidrógeno. Fuente: (Peixoto G., 2008)

A. Hidrólisis y acidogénesis: La primera fase del proceso de degradación anaerobia consiste en la hidrólisis de materiales particulados complejos (polímeros) en materiales disueltos más simples (moléculas menores), los cuales pueden atravesar las paredes celulares de las bacterias fermentativas. Esta conversión de materiales particulados en materiales disueltos es seguida a través de la adición de enzimas excretadas por las bacterias fermentativas hidrolíticas (Chernicharo, 2007).

La fermentación de productos monoméricos por estas y otras bacterias fermentativas hidrolíticas, resulta en la generación de una amplia variedad de productos finales de fermentación que incluyen acetatos, formiatos, metanol, hidrógeno y dióxido de carbono. (O'Flaherty, Collins, & Mahony, 2006).

B. Acetogénesis: Los productos de la acidogénesis son después oxidados a acetatos, hidrógeno y dióxido de carbono (O'Flaherty, Collins, & Mahony, 2006). Las bacterias sintróficas acetogénicas son las responsables de la oxidación de compuestos orgánicos intermediarios, como propionato y butirato, en un sustrato apropiado para los microorganismos metanogénicos (acetato, hidrógeno y dióxido de carbono).

La formación de acetato resulta en una gran producción de hidrógeno, haciendo que el valor de pH en el medio acuoso decrezca. En los sistemas de tratamiento la reducción de hidrógeno en la fase líquida es afectada principalmente por microorganismos metanogénicos hidrogenotróficos y también por bacterias reductoras de sulfato (Chernicharo, 2007).

C. Metanogénesis: En ausencia de aceptores de electrones, tales como sulfatos o nitratos, la digestión anaerobia de la materia orgánica ocurre por la acción de la secuencia cooperativa de un número diferente de bacterias (O'Flaherty, Collins, & Mahony, 2006). La etapa final del proceso de conversión anaerobia de compuestos orgánicos en metano y dióxido de carbono es efectuado por los microorganismos metanogénicos. (Chernicharo, 2007).

Los organismos metanogénicos son estrictamente anaerobios *Archea* los cuales se pueden subdividir en dos grupos:

1. Especies hidrogenofílicas o especies hidrogenotróficas, las cuales forman metano por la reducción de H_2/CO_2 .
2. Metanogénicas acetoclasticas o acetotróficas, las cuales generan metano por la descarboxilación de acetato. Las metanogénicas acetoclasticas son consideradas las especies metanogénicas más importantes, el 70% del metano total generado durante la digestión anaerobia es por esta ruta. (O'Flaherty, Collins, & Mahony, 2006).

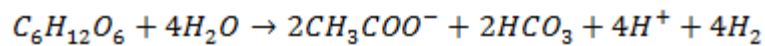
2.3. FERMENTACIÓN OSCURA

Entre los procesos de producción de hidrógeno se destaca el proceso fermentativo, pues es un proceso de bajo costo comparado con otros procesos y posibilita unir el efluente tratado con la generación de energía, por ende la etapa fermentativa de la digestión anaerobia de los residuos orgánicos es un proceso clave en la producción de hidrógeno. A través de esta etapa, los microorganismos acidogénicos descomponen la materia orgánica (Soares Fernandes, 2008).

2.3.1. Principales principios de la producción de hidrógeno via fermentación oscura

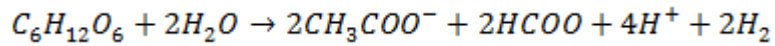
La generación de biohidrógeno a través de la fermentación oscura se logra principalmente por bacterias estrictamente anaerobias o anaerobias facultativas bajo condiciones anaerobias.

Para la estimación del rendimiento (producción) teórica de hidrógeno fermentativo se acepta como referencia la reacción de bio-transformación de glucosa a acetato (Ntaikou , Antonopoulou , & Lyberatos , 2010). Estando definido el rendimiento como la cantidad de H₂ producido por cantidad de sustrato consumido (mol H₂/mol de glucosa) (Argun & Kargi , 2011).

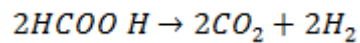


$$\Delta G^0 = -206,3 \text{ Kg. mol}^{-1} \quad (6)$$

De acuerdo con la reacción (6) el máximo rendimiento teórico de biohidrógeno de fermentación de la glucosa es 4 mol H₂ por mol de glucosa consumida, se puede ver también en dos pasos vía fermentación de glucosa a acetato y formiato de acuerdo con las reacciones (7 a) y (7b).

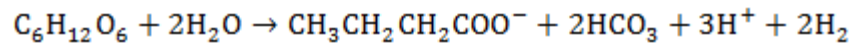


$$\Delta G^0 = -209,1 \text{ Kg.mol}^{-1} \quad (7a)$$



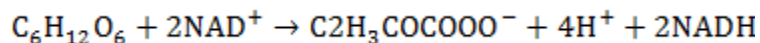
$$\Delta G^0 = -6 \text{ Kg.mol}^{-1} \quad (7b)$$

Cuando solo el butirato es el único subproducto orgánico, la máxima producción teórica de hidrógeno convierte 2H₂ por mol de glucosa consumida de acuerdo con la reacción (8):



$$\Delta G^0 = -254,8 \text{ Kg.mol}^{-1} \quad (8)$$

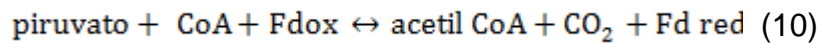
El paso básico en todas las reacciones anteriores es el metabolismo de la glucosa hacia piruvatos como se muestra en la reacción 9, a través de la cual 2 moles de hidrógeno pueden teóricamente ser generados durante la subsecuente generación del producido NADH ($NADH + H^+ \rightarrow NAD^+ + H_2$). En la mayoría de bacterias el metabolismo de la glucosa a piruvato es llevado a cabo vía ruta metabólica EMP.



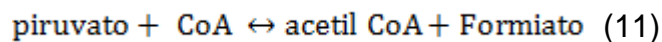
$$\Delta G^0 = -112,1 \text{ Kg.mol}^{-1}$$

Sin embargo la sustancia clave para la producción de hidrogeno de la materia orgánica es el acetil CoA, el cual es más productor de piruvato. La subsecuente tasa de acetil CoA es el factor que define si la máxima producción teórica de hidrogeno será 4 o 2 mol de H₂ por mol de azúcar consumido.

Dependiendo del sistema enzimático que el microorganismo tenga, el acetil CoA puede ser generado a través de las reacciones 10 y 11. (Ntaikou , Antonopoulou , & Lyberatos , 2010)



$$\Delta G^0 = -19,2 \text{ Kg.mol}^{-1}$$



$$\Delta G^0 = -16,3 \text{ Kg.mol}^{-1}$$

La reacción 10 es catalizada a través de la enzima piruvato - ferredoxin oxido reductora, donde el ferredoxin es la coenzima que actúa como receptor de electrones (Ntaikou , Antonopoulou , & Lyberatos , 2010).

Comprendiendo que la fermentación oscura se puede realizar bajo condiciones mesofílicas (25⁰C- 40⁰C), termofílicas (40⁰C- 65⁰C), o hipertermofílicas (> 80⁰C). La operación termofílica ha reportado el mayor rendimiento en H₂ debido al crecimiento limitado de las consumidoras de H₂ y la actividad metabólica más rápida de las bacterias (Argun & Kargi , 2011), (Sinha & Anjana, 2011).

2.3.2. Rendimientos según tipos de fermentación.

A. Fermentación oscura en batch: Los rendimientos en la formación de hidrogeno están usualmente entre 1,5 y 2,5 mol H₂/ mol⁻¹ glucosa, en la mayoría de estudios de fermentación oscura sin embargo se ha reportado actualmente un rendimiento entre 3 y 4 mol H₂/mol glucosa (Argun & Kargi , 2011).

B. Fermentación oscura continua: Se han usado cultivos suspendidos e inmovilizados para emplear reactores de tanque con agitación continua CSTR y reactores anaerobios de flujo ascendente UASB para la producción de biohidrógeno (Argun & Kargi , 2011). Se han reportado producciones de hidrógeno en continuo entre 0,58 molH₂/mol glucosa y 2,80 molH₂/mol glucosa. La más alta producción de hidrógeno es de 1,7 molH₂/mol glucosa, obtenido con un alimento de glucosa de 10g/L, un TRH= 0,25 h, pH=5,5 y una T=37⁰C. Ningún sistema suspendido a continuo ha sido capaz de proveer una alta producción de hidrógeno, con altas cargas de sustrato y bajos niveles de TRH (Argun & Kargi , 2011).

C. Fermentación oscura fed-batch: La alta densidad celular de la operación en fed-bach tiene considerables ventajas comparado con la operación en batch y continuo y es usualmente empleada para superar sustrato/producto y los compuestos tóxicos inhibitorios encontrados en altas tasas de concentración del sustrato (Argun & Kargi , 2011).

En el fed-bach la solución del sustrato se adiciona a una tasa suficiente para soportar las comunidades bacterianas y eliminar la inhibición del sustrato que no se remueven en el efluente (Argun & Kargi , 2011).

2.3.3. Bacterias fermentativas.

La producción de hidrógeno puede ser llevada a cabo a través de un amplio rango de microorganismos con diversos requerimientos en términos de preferencia de sustrato, pH y temperatura. Estos parámetros no solo determinan el crecimiento de los microorganismos, sino también tienen un rol crucial en la ruta metabólica

que los microorganismos seguirán, afectando de esta manera la producción de hidrógeno (Speece , 1983).

A. **Cultivos Mixtos:** A pesar de las ventajas de los cultivos mixtos en términos económicos, su uso siempre estará hacia la predominancia de especies no productoras de hidrogeno tales como las metanogénicas, homoacetógenas y ácidos lácticos (Ntaikou , Antonopoulou , & Lyberatos , 2010).

La estrategia seguida para reducir tal posibilidad incluye por un lado un pretratamiento de la semilla a fin de remover lo más posible los microorganismos indeseados, y por otro lado el mantenimiento de condiciones ambientales y operacionales que favorezcan la predominancia de las especies productoras de hidrógeno.

En términos de pretratamiento de la semilla el tratamiento con calor es generalmente la práctica más común. Al someter los cultivos semilla a altas temperaturas, solo los microorganismos acidogénicos formadores de espuma sobreviven al choque térmico, mientras las bacterias metanogénicas no formadoras de esporas mueren. Se han reportado temperaturas de 75 °C, 100°C o incluso 121°C, mientras la duración del proceso se ha reportado entre 15 minutos y 2 horas. Alternativo al tratamiento por calor un tratamiento acido base de la semilla se ha sugerido como una posible forma para garantizar la dominancia de bacterias productoras de hidrógeno (Ntaikou , Antonopoulou , & Lyberatos , 2010). Algunos cultivos mixtos estudiados se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cultivos mixtos estudiados para la producción fermentativa de hidrógeno.

| Inóculo | Sustrato | Tipo de reactor | Rendimiento de H ₂ | Referencia |
|---|----------|-----------------|---------------------------------------|------------------------|
| Consortio: Enterobacter cloacae IIT-BT 08. Citrobacter freundii IIT-BT L 139, Bacillus coagulans IIT-BT S1 | Glucose | Batch | 41.23 mL H ₂ /gCODremovido | Kotay and Das [2006] |
| Lodos aerobios y anaerobios, sedimentos de suelos y lagos | Glucosa | Batch | 1.4 mol H ₂ / mol glucosa | Kawagoshi et al [2005] |
| Lodo anaerobio (acondicionado con calor) | Glucosa | Batch | 1.78 mol H ₂ / mol glucosa | Zheng y Yu [2005] |
| Cultivo mixto | Glucosa | CSTR | 1.93 mol H ₂ /mol glucosa | Zhang et al [2004] |
| Lodos de aguas residuales | Sacarosa | CSTR | 3.43 mol H ₂ /mol sacarosa | Lyn y Lai [2005] |
| Microflora de suelo | Sacarosa | Batch | 1.8 mol H ₂ /mol sacarosa | Logan et al [2002] |

Fuente: (Aispuro Castro, 2011)

B. Cultivos puros de sepas silvestres: Los argumentos principales son, la selectividad de sustratos, la facilidad de manipulación del metabolismo por la alteración de condiciones de crecimiento, la alta productividad de hidrógeno como efecto de la reducción de bioproductos no deseados así como la repetibilidad del proceso. Por otro lado los cultivos puros pueden ser bastantes sensibles a la

contaminación y su uso demanda, la presencia de condiciones asépticas (Ntaikou , Antonopoulou , & Lyberatos , 2010).

Según (Chernicharo, 2007), (Ntaikou , Antonopoulou , & Lyberatos , 2010), y (Vijayaraghavan & Soom , 2004), existe un amplio rango de microorganismos capaces de producir hidrógeno, entre las que se destacan:

- *Costridium, micrococcus y staphylococcus*, que son géneros productores de lipasas que degradan los lípidos a ácidos grasos.
- *Bacteroides, Butyvidrio, Clostridium, Fusobacterium, Selenomonas, Streptococcus, Proteus, Peptococcus y Bacillus* que son géneros productores de proteasas, para la generación de proteínas y aminoácidos.
- *Clostridium, Staphylococcus, Acetividrio, Eubacterium*, que son géneros productores de amilasas, para la degradación de azúcares menores.
- anaerobias estrictas como *Clostridia , Methyloctrophos y Bacterias metanogénicas, Arqueas*
- anaerobias facultativas como *E. Coli, Enterobacter, Citrobacter* e incluso aeróbicas del género *Alcaligenes, Bacillus*.

Por ende el rendimiento de hidrogeno a partir de especies de *Clostridium* tales como *C. Bytirium, C. Acetobutyrium, C. Beijerinckii, C. Thermolacticum, C.tyrobutyrium, C. Thermocellum y C. Pararputrificum* son ejemplos de microorganismos estrictamente anaerobias y formadoras de esporas que generan gas hidrógeno durante la fase de crecimiento exponencial, el cual generalmente es mayor, en relación con las bacterias aerobias facultativas como las *Enterobacter Sp* (Peixoto G. , 2008).

La Tabla 2. muestra algunos estudios que han sido realizados utilizando cultivos puros a partir de glucosa y sacarosa (Wang & Wan, Optimization of fermentative hydrogen production process using genetic algorithm based on neural network and response surface methodology, 2009). Mientras que la Tabla 3 muestra algunos estudios de la producción de hidrógeno utilizando cultivos mixtos (Davila Vazquez , Arriaga , Alatraste Mondragon , de León Rodriguez , Rosales Colunga , & Razo

Florez , 2007). Las bacterias fermentativas como las especies de Clostridium y Enterobacter son los principales géneros con la habilidad de producir hidrógeno, de las cuales Clostridium ha sido reconocida como un productor de hidrógeno muy efectivo (Chen , Tseng , Lee , & chang , 2005), (Aispuro Castro, 2011).

Tabla 2. Cultivos puros estudiados para la producción fermentativa de hidrógeno.

| Inóculo | Sustrato | Tipo de reactor | Rendimiento de H₂ | Referencia |
|------------------------------------|-----------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| C. acetobutylicum | Glucosa | Batch | 2 mol/mol glucosa | Chin et al (2003) |
| C. pasteurianum CH ₄ | Sacarosa | Batch | 2.07mol/mol hexosa | Lo et al (2008) |
| E. aerogenes HO-39 | Glucosa | Batch | 1 mol/mol glucosa | Yokoi et al (1995) |
| E. cloacae IIT-BT 08 | Sacarosa | Batch | 6 mol/mol sacarosa | Kumar y Das (2000) |
| Escherichia coli | Glucosa | Batch | 2mol/mol glucosa | Bisaillon et al (2006) |
| Escherichia coli | Glucosa | Continuo | 2mol/mol glucosa | Turcot et al (2008) |

Fuente: (Aispuro Castro, 2011)

Así mismo (O'Flaherty, Collins , & Mahony, 2006), muestra otros grupos microbiológicos involucrados en la digestión anaerobia, como lo son:

1. Bacterias reductoras de sulfato BRS: Las bacterias reductoras de sulfatos BRS son un grupo de bacterias estrictamente anaerobias que tienen la capacidad de emplear el sulfato como un aceptor terminal de electrones para la oxidación de hidrógeno molecular y una amplia variedad de compuestos orgánicos.

La manifestación de los principales problemas relacionados con BRS incluye:

- a. Una reducción en la producción de metano.
- b. Inhibición del efecto de hidrógeno en muchas bacterias de grupos tróficos involucrados en la digestión anaerobia, lo cual disminuye el desempeño del reactor.
- c. Mal olor, corrosión de tuberías, bombas, entre otras, necesarias para la depuración de el biogás y los efluentes.

2. Bacterias homoacetogénicas: Son otro grupo trófico, estos organismos son capaces de tener un crecimiento autotrófico y heterotrófico, generando acetato como único producto final de compuestos H_2/CO_2 o multi-carbono.

2.4 PARÁMETROS DE INFLUENCIA EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

Se ha visto que la producción de hidrógeno se ve influida por varios factores, entre los que se encuentran el tipo y la concentración de sustrato (Okamoto , Miyahara , Mizuni , & Noike , 2000), la relación carbono/nitrógeno, el pH (Fang H & Liu , 2002), el tiempo de retención de hidráulica (Fan, 2006) y la temperatura (Zhang , Liu, & Fang , 2003). De esta manera, se ha estudiado la producción de hidrógeno a partir de residuos orgánicos (Noike & Mizuno , 2000), de azúcares, almidón y materiales celulósicos (Lloyd & Wyman , 2005) y desechos de la industria papelera (Valdez vazquez , Sparling , Risbey , Rinderknecht , & Poggi Varaldo , 2005), (Buitrón & Carvajal, 2009) lo que nos lleva a resaltar unos de ellos como se muestra a continuación.

A. pH del cultivo:

Es importante mencionar que debajo de 4,7 es altamente desfavorable para la producción de hidrógeno, puesto que inhibe la actividad de la hidrogenasa y otras enzimas involucradas en el proceso (Lay, 2000), (Show, Lee, & Chang, 2011).

Algunas investigaciones muestran que el pH optimizado para la producción de hidrógeno está en la franja de 5,0 a 6,5 (Soares Fernandes, 2008), empleando en la mayoría de estudios cultivos de bacterias puras o mixtas (Show, Lee, & Chang, 2011).

A su vez en algunos estudios se empleó flora mixta donde se usó un pH bajo (4,2-5,0) que soportó la producción máxima de hidrógeno. Sin embargo en cultivos puros muy pocas cepas dan una producción máxima de hidrógeno con un pH por debajo de 6,0 (Sinha & Anjana, 2011) .

B. Tiempo de retención hidráulica (TRH):

De acuerdo con (Show, Lee, & Chang, 2011), el tiempo de retención hidráulica puede ser empleado como una herramienta para seleccionar la población microbiana cuyas tasas de crecimiento son alcanzadas con la dilución mecánica creada por la tasa de flujo volumétrico.

La tasa de crecimiento específico de bacterias productoras de metano es cerca de 0,0167- 0,02 h⁻¹, lo cual es mucho más bajo que las bacterias productoras de hidrógeno cerca de 0,172 h⁻¹.

C. Presión parcial de hidrógeno:

La producción de hidrógeno es menos favorable cuando aumenta la presión parcial de hidrógeno. Por lo tanto es importante remover el exceso de hidrógeno de los sistemas para mantener la producción de hidrógeno. Múltiples estudios han demostrado que reducir la presión parcial de hidrógeno puede aumentar considerablemente la producción de hidrógeno (Show, Lee, & Chang, 2011).

D. Nutrientes:

En el proceso de fermentación de hidrógeno se necesitan suplementos como nitrógeno, fosfato y otros minerales traza inorgánicos. Estudios previos indicaron que el nitrógeno orgánico parece ser más favorable para el desarrollo del

hidrógeno, comparado con uno inorgánico. El fosfato es uno de los nutrientes inorgánicos importantes requerido para una producción óptima de hidrógeno (Show, Lee, & Chang, 2011).

E. Temperatura:

(Zhang & Shen , 2005), observaron que la temperatura influye en la producción de hidrógeno. En la franja de 25°C a 40 °C ocurren las mejores eficiencias del proceso principalmente en condiciones próximas a la ideal (35°C) para el funcionamiento de los catalizadores bioquímicos.

Así mismo muchas investigaciones terminaron concluyendo que las temperaturas que varían de 30 °C a 36,8 °C, son definidas como temperaturas optimizadas para sistemas anaerobios fermentativos productores de hidrógeno (Soares Fernandes, 2008).

F. Concentración del sustrato:

El efecto en la concentración del sustrato para la producción de hidrógeno, ha sido un punto de debate. En estudios concernientes se ha encontrado que la producción de hidrógeno aumenta con el aumento de la concentración de glucosa, mientras otros encontraron disminución en la producción de hidrógeno con adición de hexosa (Show, Lee, & Chang, 2011).

No es tan importante la presencia o ausencia de nutriente sino mas la proporción en la cual están disponibles. Según (Lin & Lay, 2004), la proporción de carbono y nitrógeno pueden influir significativamente en el contenido de hidrógeno en biogás y la velocidad de formación de gas hidrógeno (Peixoto G. , 2008)

A su vez y como se reporta en diferentes estudios los carbohidratos son la principal fuente de hidrógeno, en consecuencia los residuos y la biomasa rica en azúcares y los carbohidratos complejos resulta ser la materia prima más adecuada la generación de hidrógeno (Show, Lee, & Chang, 2011).

G. Inóculo:

(Kawagoshi , y otros, 2005), demostraron que el inóculo es uno de los factores determinantes en la producción de hidrógeno, un estudio realizado con inóculo obtenido de lodos activados obtuvo 0,15 mol H₂. Mol⁻¹ de glucosa y un inóculo obtenido de lodo anaerobio digerido obtuvo 1,35 mol H₂. Mol⁻¹ de glucosa.

Los miembros de *Clostridium* y *Enterobacter* fueron los más empleados como inóculos para la producción de hidrógeno fermentativo. La dificultad de emplear cultivos mixtos es que en el medio coexisten bacterias consumidoras y productoras de hidrógeno. Esto se puede solucionar si se hacen condiciones duras a las bacterias consumidoras (Sinha & Anjana, 2011).

Diversos métodos de pre tratamiento incluyen choque térmico, aireación ácido-base, congelación y descongelación entre otros (Sinha & Anjana, 2011).

2.5. CONDICIONES AMBIENTALES

Las condiciones ambientales que prevalecen en un reactor anaerobio parcialmente dependen de las condiciones impuestas del proceso. Estas generalmente están relacionadas con las características del agua residual y las medidas específicas tomadas, tales como la adición de químicos.

2.5.1. Nutrientes y elementos traza

Los organismos requieren todos los elementos esenciales para su crecimiento. El proceso comúnmente empleado, para evaluar los requerimientos de nutrientes están basados en el rendimiento del crecimiento y en la composición de la biomasa (Lettinga , 1995).

Cabe señalar que de acuerdo con (Speece , 1983) el extracto de levadura es comúnmente empleado como fuente de nutrientes orgánicos e inorgánicos traza,

tomando a cuatro elementos tales como hierro, cobalto, níquel y sulfuros como nutrientes obligatorios para la metanogénesis para convertir acetato a metano; el molibdeno, tungsteno y selenio también han sido reportados como metales traza requeridos.

A pesar del hecho que los sulfuros pueden afectar perjudicialmente la producción de metano por la precipitación de metales traza esenciales, y estos por si solos son tóxicos a concentraciones mayores de 100 a 150mg/L de hidrógenos (Speece , 1983).

2.5.2. Toxicidad

La toxicidad es un factor importante que se debe considerar, junto con la presencia de nutrientes y elementos traza. Los organismos anaerobios, particularmente los metanógenos, son bastante susceptibles a una larga variedad de componentes. El factor clave en la aplicación del tratamiento anaerobio de aguas residuales tóxicas es la adaptación. (Lettinga , 1995)

En el caso del oxígeno de hecho podría ser muy perjudicial para la metanogénesis, su presencia podría impedir la aplicación de tratamiento anaerobio para aguas residuales de muy baja resistencia (Lettinga , 1995).

Con algunas excepciones, las metanogénicas son consideradas comúnmente por ser las más sensibles a la toxicidad de todos los microorganismos en general de la conversión anaerobia. Algunos tóxicos encontrados en aguas residuales industriales son (Speece , 1983):

- Catálisis de metales pesados de procesos químicos
- Farmacéuticos
- Detergentes y desinfectantes empleados en limpieza de equipos
- Inhibidores formados como productos secundarios (cianuros en operaciones de coque)
- Procesos tóxicos en lixiviados (formaldehídos)
- Tratamientos con inhibidores químicos para la preservación de alimentos (clorofenil isopropil N-3 carbonato para inhibir el deterioro de papas).

2.6. TÉCNICAS PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO.

Los principales sistemas de producción de biohidrógeno (fotólisis directa e indirecta, foto- fermentación y fermentación oscura) actualmente están bajo intensa investigación con el fin de desarrollar métodos que mejoren tanto las tasas de producción de H₂ como sus rendimientos. Por ejemplo, se ha reportado el mejoramiento de la producción de H₂ con la utilización de un mutante por radiación UV de *Rhodobacter sphaeroides*. Esta mutación hizo reducir el contenido de carotenoides debido a que este tipo de pigmentación está presente en exceso en la célula limitando la incidencia de la luz en el sistema fotosintético y haciendo que la producción en una cepa silvestre de *Rhodobacter sphaeroides* sea menor que en la cepa mutante (Kondo, Arakawa, Hirai, T, Hara, & J, 2002), (Bedoya, Castrillón, Ramirez, Vásquez, & Arias, 2008).

El mejoramiento genético de algunos microorganismos, realizando cambios o mutaciones en las enzimas involucradas que las hace más resistentes a los inhibidores como el oxígeno, eliminando las hidrogenasas captadoras de hidrógeno e incrementando los niveles de actividad de la hidrogenasa bidireccional, han demostrado mejoras en los rendimientos y la producción de hidrógeno (Franchi, Tosi, Scolla, Penna, Rodriguez, & Pedroni, 2004), (Kruse, y otros, 2005), (Vignais, Magnin, & Willison, 2006).

La integración de dos de los procesos más productivos, la fermentación oscura y la fotofermentación, con el fin de aprovechar al máximo las fuentes de carbono presentes en el sustrato, hacen más eficiente el proceso de producción de biohidrógeno (Nath & Das, 2004).

Esta integración permite primero la degradación de los carbohidratos hasta ácidos orgánicos implicando una producción de hidrógeno, y luego estos ácidos orgánicos son utilizados en un reactor en serie conectado al anterior en el cual los microorganismos fotofermentadores transforman estos ácidos en presencia de luz a hidrógeno y CO₂ (Eroglu, Eroglu, Turker, & Yucel, 2006), (Redwood & Macaskie, 2006).

La configuración de biorreactor más utilizada para la producción de biohidrógeno por fermentación, es el reactor continuo de tanque agitado (CSTR) (Yang, Shao, Lu, Shen, Xu, & Yuan, 2006). Estos reactores ofrecen una simple construcción, fácil operación y mezcla homogénea efectiva. Sin embargo, en estos reactores el tiempo de retención hidráulica (TRH) controla el crecimiento microbiano y por lo tanto el TRH debe ser mayor que la máxima tasa de crecimiento microbiano.

La ventaja de un reactor CSTR es su tasa de producción, la cual en algunos casos es mayor. Un problema potencial con este tipo de reactores es la pérdida de hidrogeno a través de la formación de metano. Dado que el crecimiento celular ya no es directamente controlado por TRH en los sistemas que emplean biomasa microbiana retenida, un lento crecimiento de metanógenas puede ocurrir incluso en altas tasas de rendimiento líquido (Hallenbeck & Ghosh, 2009).

También existen otros tipos de biorreactores que actualmente operan, la mayoría basados en los procesos de digestión anaeróbica para producir metano. En la producción de biohidrógeno, los reactores deben retener las bacterias productoras para obtener una mayor capacidad catalítica de éstas y permitir grandes tasas de carga orgánica, lo que a su vez permite llegar a altas tasas volumétricas de producción de hidrógeno, sin dejar de lado que se debe evitar la retención de bacterias metanógenas o productoras de propionato (Bedoya, Castrillón, Ramirez, Vásquez, & Arias, 2008).

Se han utilizado reactores biológicos secuenciales (SBR) en los cuales los microorganismos son retenidos por un periodo de inmovilización y se han encontrado tasas volumétricas y específicas de producción de hidrógeno similares a las encontradas en CSTRs.

Los métodos para retener la biomasa en los reactores incluyen la inmovilización en matrices de etilén-vinil-acetato (EVA), celulosa, capas de alginato-polivinil-acetato, carbón activado y alginato de calcio, aprovechando la formación de biopelículas en estos soportes (Wu, Lin, & Chang, 2005), (Wu & Chang, 2007). También se ha retenido la biomasa con membranas, pero no se recomienda como

una buena opción, pues los biorreactores de membrana poseen grandes costos de operación. Otras de las configuraciones que también han sido utilizadas son reactor de lecho fluidizado (FBR), de lecho empacado (PBR) y anaeróbico bafleado de tres compartimentos (ABR) (Chang, Wu, & Chang, 2007), (Lee, Lin, & Chang, 2006), (Wang, Zhou, & Li, 2006).

La retención de bacterias para producir hidrógeno puede incrementar la biomasa y las tasas de carga orgánica, además de presentar ventajas en la creación de ambientes locales anaeróbicos que favorecen el proceso. Las principales configuraciones de biorreactores de lecho empacado con biomasa inmovilizada, generalmente cultivos mixtos libres de metanógenos, son el reactor de lecho ascendente anaerobio (UASB) y el reactor de cargador inducido granular (CIGSB) (Wolfrum & Weaver, 2000), (Chang & Lin, 2004), (Lee & Lo, 2004), (Gavala, Skiadas, & Ahring, 2006).

Finalmente, la optimización de condiciones de cultivo tales como la intensidad de la luz, pH, temperatura, contenido de nutrientes, mantenimiento de una baja presión parcial, eliminación de microorganismos competidores y el diseño de nuevos bioreactores, podrán contribuir al incremento en la producción de H_2 .

2.7. METODOLOGÍAS DE MEDICIÓN DE GASES.

Tabla 3. Síntesis de procesos para la cuantificación de producción de H₂

| METODOLOGÍA | DESCRIPCIÓN |
|--|---|
| <p>MÉTODOS ANALÍTICOS</p> | <p>Se pueden determinar alcoholes y ácidos por cromatografía gaseosa. La producción de hidrógeno puede ser medida por un medidor de caudal de gas MilliGas-counter da Ritter, así mismo parámetros de monitoreo tales como sólidos suspendidos volátiles (SSV), sólidos totales (ST), pH, Temperatura entre otros son realizados empleando la metodología dada por (APHA , 2005). El análisis de biogás específicamente hidrógeno, dióxido de carbono y metano, por cromatografía gaseosa fue desarrollada teniendo como base la metodología desarrollada por (Stenerson , 2004).</p> |
| <p>MEDICIÓN DEL CAUDAL VOLUMÉTRICO DE GAS</p> | <p>La medición de hidrógeno es realizada por medio de un medidor de gas en línea, al cual se le adiciona una solución de hidróxido de sodio (N_aOH) con concentración de 5 mol.L⁻¹, para que el dióxido de carbono del biogás sea retenido en la solución, facilitando de esta manera que solo el gas hidrógeno sea medido (Peixoto G. , 2008).</p> |
| <p>EXAMENES MICROBIOLÓGICOS</p> | <p>La biomasa adherida al material de soporte empleado en reactores tipo batch puede ser analizada por medio de microscopía óptica y la segunda con técnicas de biología molecular como PCR y DGGE (Peixoto G. , 2008).</p> |
| <p>EXAMEN DE MICROSCOPIA ÓPTICA</p> | <p>El análisis de Gram es realizado con la intención de detectar la presencia de bacterias pertenecientes al género <i>Clostridium</i> ya que dicho método divide a los microorganismos en Gram positivas y Gram negativas, este hecho se debe a la diferente composición de la pared celular.(Peixoto G. , 2008).</p> |
| <p>ANÁLISIS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</p> | <p>Son técnicas de biología molecular DGGE y seguimiento del DNA que tiene como objeto investigar los microorganismos involucrados en la producción de hidrógeno. Este análisis se pueden presentar dificultades debido a la extracción de DNA para la posterior aplicación en DGGE, debido a la presencia de interferencias en la muestra (Peixoto G. , 2008).</p> |

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

REACTORES.

En cuanto a metodologías de producción, en la fase experimental el rendimiento de los sistemas de bioreactores está determinado por varios factores entre los cuales se encuentran: factores asociados con las condiciones ambientales y condiciones de operación del proceso (Show, Lee, & Chang, 2011).

Para ello la fase experimental se dividió en dos etapas, la primera donde se estudió la producción de hidrógeno empleando reactores en batch con frascos tapa rosca azul (Duran[®] frascos) de 250ml, en duplicado; con un volumen reaccional de 100 ml (90 ml de medio y 10 ml de inóculo) y 150 de headspace, como se muestra en la Figura 2, llevando un control en condiciones iniciales, a los 4 y 8 días.



Figura 2. Montaje 1.

En la segunda fase se evaluó la producción de hidrógeno a partir de reactores en batch con erlenmeyers (Duran[®] frascos) de 2000ml, empleando jeringas de 60ml para realizar la toma de las muestras; los cuales fueron operados con un volumen reaccional de 1800 ml (1200 ml de medio y 600 ml de inoculo) y 600 ml de headspace, como se presenta en la Figura 3, realizando controles en condiciones iniciales y días intermedios hasta completar un periodo de 16 días.



Figura 3. Figura esquemática del reactor en bachelada.

AGUA RESIDUAL

Una de las grandes ventajas que presenta la producción de hidrógeno, considerada dentro de un entorno de protección al medio ambiente, es la posibilidad de poder utilizar residuos.

En las aguas residuales, principalmente en los efluentes de las industrias de alimentos, se pueden encontrar variedad de carbohidratos en forma de azúcares simples, almidón y celulosa, los cuales son sustratos aptos para la producción de hidrógeno.

- **Agua residual de Bavaria**

Se sabe que esta agua residual presenta la posibilidad de producción de hidrogeno, pues contiene fracciones significativas de sacarosa y demás carbohidratos, que son las fuentes preferenciales para la generación de hidrógeno (Hawkes, Dinsdale , Hawkes , & Hussy, 2002). El agua residual se obtuvo de la industria cervecera de Bavaria, ubicada en el municipio de Tocancipá (Colombia).

De acuerdo a la naturaleza del agua residual, ésta puede contener una gran variedad de compuestos; en el caso de la industria cervecera, la mayoría de estos son carbohidratos y proteínas. Para el desarrollo experimental se realizó una colecta de agua residual, la cual fue sometida a una caracterización físico-química, donde se analizaron: sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos totales (SST), sólidos totales (ST), sólidos totales volátiles (STV), alcalinidad total, sulfatos, fosforo, DQO, DBO₅ y pH; de acuerdo con los métodos descritos por (APHA , 2005). Las características de esta agua residual se presentan en la Tabla 4.

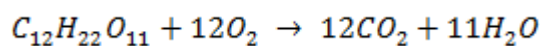
Tabla 4. Características del agua residual de Bavaria.

| PARAMETRO | UNIDAD | MEDIA +DS |
|-------------------------------------|------------------------|--------------|
| pH | | 6,7±0,5 |
| Alcalinidad Parcial | mgCaCO ₃ /L | 392±50 |
| Alcalinidad Intermedia | mgCaCO ₃ /L | 729±50 |
| Alcalinidad Total | mgCaCO ₃ /L | 1122±1 |
| Sólidos Totales | mg/L | 83302±50 |
| Sólidos Suspendidos Totales | mg/L | 2116±67 |
| Sólidos Suspendidos Volátiles | mg/L | 1800±1 |
| DQO | mg /L | 994±419 |
| DBO ₅ | mg /L | 46±37 |
| Sulfatos | mg SO ₄ /L | 9±0.1 |
| Fosforo | mg PO ₄ /L | 4±0.26 |

- **Agua control**

Se elaboro un agua sintética empleando como fuente de carbono, la sacarosa. Mediante estequiometria se determino la cantidad de sacarosa necesaria para obtener un valor de DQO correspondiente a 250 mg/L como se muestra a continuación.

➤ Composición de sacarosa.



Masa atómica

C=12

H=1

O=16

➤ Cálculo.

$$DQO = \frac{\text{Masa atómica } (12O_2)}{\text{Masa atómica } (C_{12}H_{22}O_{11})} * \text{cantidad sacarosa.}$$

$$\text{Cantidad sacarosa.} = \frac{DQO * \text{Masa atómica } (C_{12}H_{22}O_{11})}{\text{Masa atómica } (12O_2)}$$

$$\text{Cantidad sacarosa.} = \frac{250 \text{ mg/L} * (12 * 12 + 22 + 11 * 16)}{(24 * 16)}$$

$$\text{Cantidad sacarosa.} = \frac{250 \text{ mg/L} * 342}{384}$$

$$\text{Cantidad sacarosa.} = 222,66 \text{ mg/L}$$

MEDIO DE ALIMENTACIÓN

En cada uno de los reactores las aguas empleadas fueron diluidos para alcanzar un valor de DQO= 250 mg/L, con el objetivo de poder trabajar en las mismas condiciones que el agua residual real. Los efluentes se enriquecieron con los nutrientes mostrados en la Tabla 5 (Soares Fernandes, 2008).

Tabla 5. Composición de nutrientes utilizados.

| COMPUESTO | CONCENTRACIÓN (mg.L⁻¹) |
|-------------------------------|--|
| Urea | 6 |
| Sulfato de níquel | 0,15 |
| Sulfato ferroso | 0,75 |
| Cloruro férrico | 0,075 |
| Cloruro de calcio | 0,618 |
| Cloruro Cobalto | 0,012 |
| Oxido Selenio | 0,0108 |
| Fosfato de potasio Monobásico | 1,608 |
| Fosfato de potasio Dibásico | 0,39 |
| Fosfato de Sodio Dibásico | 0,828 |

Fuente: (Soares Fernandes, 2008)

INÓCULO.

Para el desarrollo del experimento se colocó un inóculo obtenido de un reactor Anaerobio de Flujo Ascendente UASB proveniente de la planta de tratamiento de la industria cervecera de Bavaria, que se centrifugó a 1600 rpm durante 1 min (Heraeus, Labofuge 2000). Al inicio de cada montaje se evaluó la cantidad de sólidos totales (ST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) con el fin de garantizar condiciones iniciales iguales.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El montaje experimental se desarrolló mediante el siguiente protocolo:

1. Medición de la DQO al agua residual de Bavaria (este valor debe ser más o menos de 250 mg/L).
2. Preparación del agua control bajo las condiciones de DQO anteriormente descritas.

3. Adición del medio de alimentación descrito en la Tabla 5.
4. Inoculación y ajuste del pH; en un valor de 5,0 con ácido sulfúrico o hidróxido de sodio (1 mol/L).
5. Montaje.

Montaje 1.

Se emplearon reactores en régimen Batch, colocando una bomba en cada una de las botellas y asegurándolas con cinta del lacre de PTFE para evitar cualquier fuga. El ensayo se desarrolló mediante fermentación oscura, cubriendo por completo las botellas con papel aluminio, evitando la aparición de microorganismos fototróficos y controlando la temperatura en 40°C por medio de un baño maría como se muestra en la Figura 4.



Figura 4. Montaje experimental 1.

Montaje 2.

Se utilizaron Erlenmeyers, los cuales fueron asegurados con un tapón de caucho y cinta del lacre de PTFE con el fin de evitar cualquier fuga de gases. Así mismo, en el montaje se implemento un sistema de succión mediante mangueras y jeringas, que permitió la toma de muestras de una manera controlada. Cada uno de los Erlenmeyers fue cubierto con papel aluminio en una cámara oscura, sin agitación a una temperatura de 34°C como se observa en la Figura 5.



Figura 5. Montaje experimental 2.

6. Periódicamente se tomaron muestras para ser analizadas y evaluadas mediante la toma de diferentes parámetros como se muestra en la Tabla 6 de acuerdo con (APHA , 2005) con el fin de observar su comportamiento y poder evaluar la producción de gases. Las muestras se tomaron en intervalos de 4 días para el montaje 1 teniendo un total de 6 muestras y cada 2 ó 3 días para el montaje 2, teniendo un total de 18 muestras.

Tabla 6. Parámetros evaluados.

| PARAMETRO | UNIDAD | MÉTODO |
|------------------|---------------|--------------------|
| pH | | 4500H ⁺ |
| DQO | mg /L | (5220D) |
| T | °C | |
| AVT | mgHAc/L | (2320) |

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

A continuación son presentados y analizados los resultados de las dos etapas de este trabajo.

4.1. PRIMERA ETAPA DEL EXPERIMENTO

En esta etapa, se alcanzó un total de 3 muestras para cada agua, con intervalos de 4 días. De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa el siguiente comportamiento en los parámetros evaluados.

- **Variación de la temperatura y pH**

En el desarrollo experimental se tuvo una temperatura inicial de $19.05\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.2$, fijando en el baño maría el valor de 40°C recomendado para procesos anaerobios.

Dentro de los estudios comparativos realizados con respecto al efecto del pH en la producción de H_2 se ha mostrado que el rango óptimo para lograr la máxima producción está entre 4.5 y 8.0 (Show, Lee, & Chang, 2011). El valor de pH inicial para el agua control fue de 7,36 y para el agua residual de Bavaria fue de 7,27; los cuales fueron ajustados a un pH inicial de 5 con el fin de tener un mayor control en la producción de hidrógeno.

En la Figura 6 se evidencia que tanto el agua residual como el agua control presentan un comportamiento similar variando en un rango entre 5 y 7,5 el cual está dentro del valor óptimo para la producción de hidrógeno, este comportamiento presenta una tendencia al aumento.

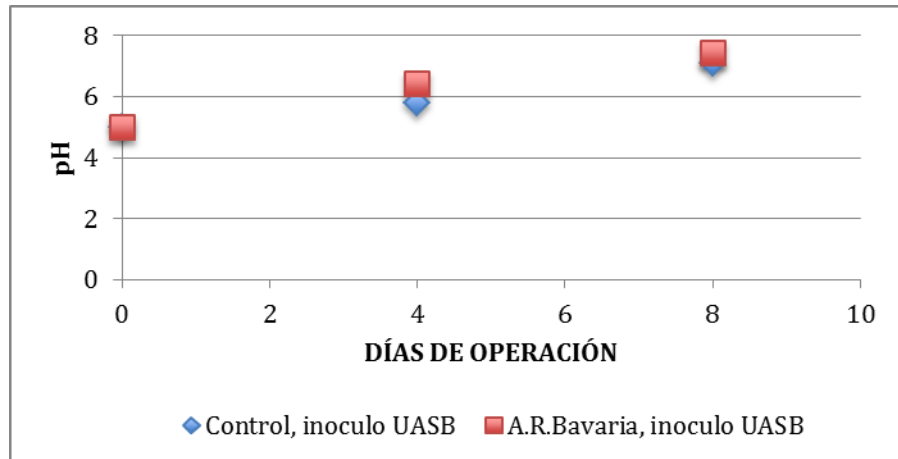


Figura 6. pH, Montaje 1.

- **Reducción de DQO**

Para la producción de hidrógeno, es necesario que la DQO se mantenga constante y si es el caso disminuya muy poco (Peixoto G. , 2008). En la Figura 7 se puede observar que los reactores presentaron un comportamiento decreciente con respecto a la DQO, durante los 8 días de operación, siendo más significativa la disminución en el agua control. Por lo tanto se puede concluir que el experimento presenta una condición adecuada en relación con este parámetro para la producción de hidrógeno.

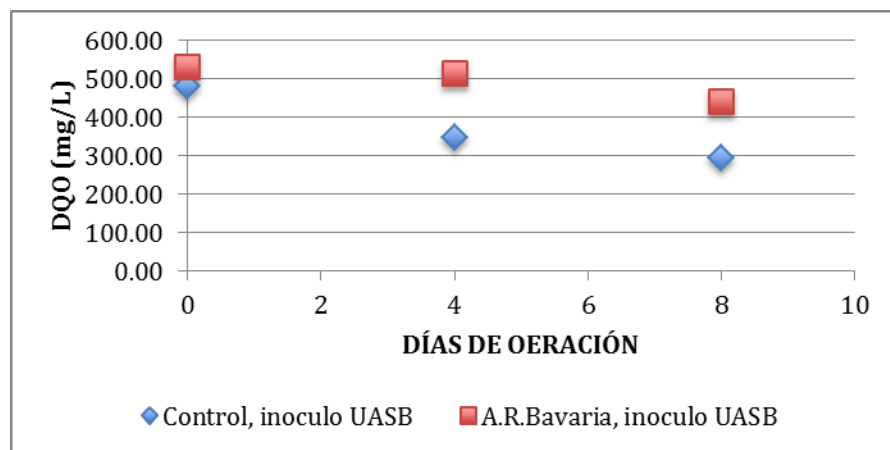


Figura 7. DQO, Montaje 1.

- **Generación de AVT**

De acuerdo al comportamiento de los reactores, los resultados no fueron óptimos, debido a que no se presentó un aumento considerable en la generación de AVT (Soares, Peixoto, Rui, Saavedra del Aguila, & Zaiat, 2010), puesto que la muestra que contenía el agua residual de Bavaria, presentó una disminución mayor en relación a el agua control como se presenta en la Figura 9.

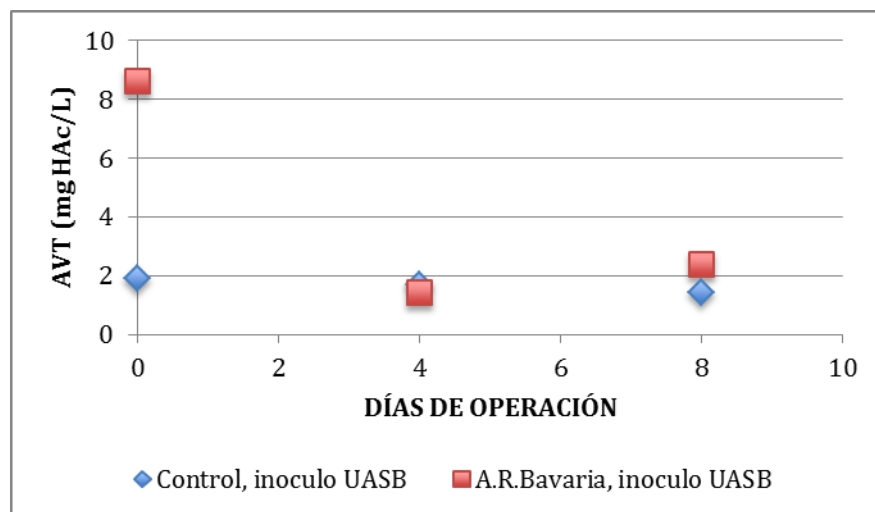


Figura 8. AVT, Montaje 1.

4.2. SEGUNDA ETAPA DEL EXPERIMENTO

La segunda parte de la fase experimental, consistió en dos reactores que operaron en las mismas condiciones, y a los cuales se les realizó un seguimiento de parámetros de control, durante un período de tiempo de 17 días con toma de muestras en intervalos de 2 a 3 días. Los resultados presentaron el siguiente comportamiento.

- **Variación del pH y temperatura.**

Durante el tiempo de operación de estos dos reactores, el pH aumento un poco, manteniéndose en una rango óptimo (5 a 6,1) para la producción de hidrógeno. Al mismo tiempo, se registró una temperatura inicial de 19,8 °C en ambas aguas, manteniéndola en 32°C en la cámara anaerobia.

Es importante mencionar que la producción de hidrógeno se da en un amplio rango, encontrándose que a valores de pH menores que 4 y mayores de 12 se inhibe por completo la producción de dicho gas (Bedoya, Castrillón, Ramirez, Vásquez, & Arias, 2008). Con base en lo anterior se puede decir que al controlar inicialmente dicho parámetro en los dos montajes se presentó un comportamiento creciente, el cual se mantuvo dentro de los valores óptimos referenciados en la literatura.

De igual manera se puede pensar que la producción de hidrogeno se pudo dar ya que los valores presentes en la Figura 9 son reconocidos como valores de alta producción de hidrógeno los cuales están entre el rango de 5,5 a 5,7.

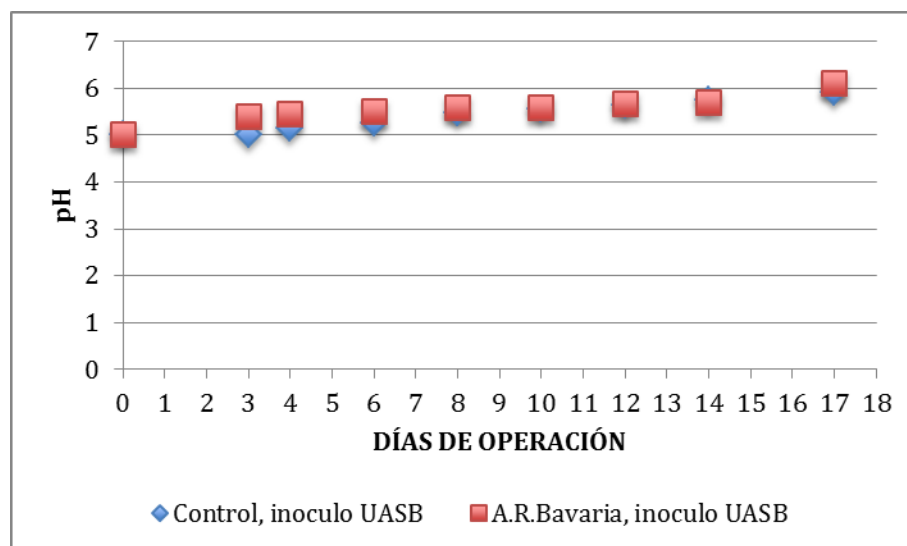


Figura 9. pH, Montaje 2.

- **REDUCCIÓN DE DQO**

Los resultados obtenidos mostraron ser buenos para la producción de hidrógeno, presentándose valores constantes en algunos periodos en especial para el agua residual de Bavaria. Igualmente, la tendencia de la DQO muestra una disminución más significativa para el agua control en relación con el agua residual de Bavaria a partir del 5 día de operación, lo cual indica que son mejores los resultados para el agua residual de Bavaria.

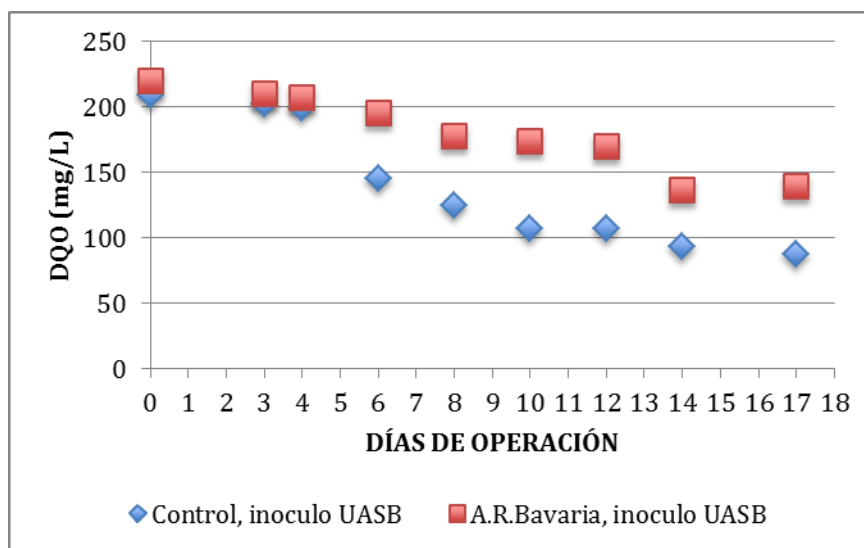


Figura 10. DQO, Montaje 2.

- **GENERACIÓN DE AVT**

La generación de ácidos volátiles aunque fue baja, tuvo un aumento gradual como se observa en la Figura 11. Este comportamiento permite pensar que con esta estrategia y bajo estas condiciones se puede producir hidrogeno.

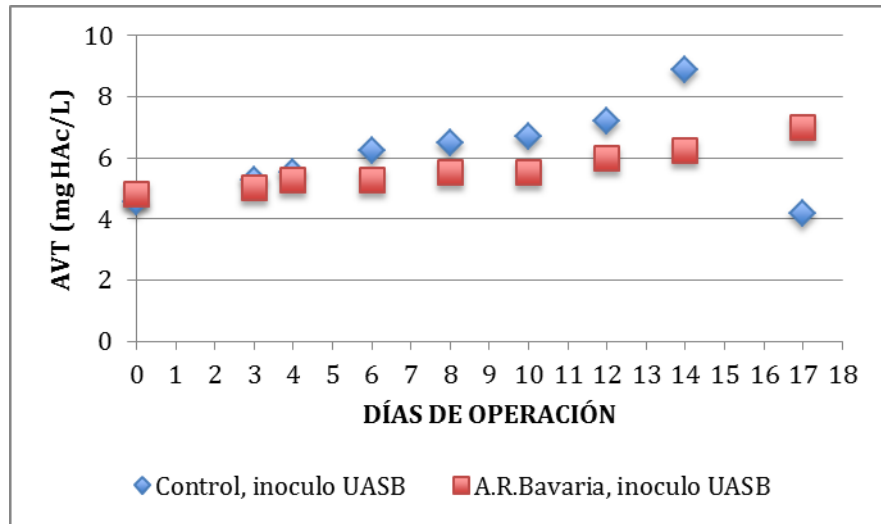


Figura 11. AVT, Montaje 2.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

5.1. CONCLUSIONES

- La revisión bibliográfica muestra que la adición de macro y micro nutrientes en cada uno de los reactores, actúa positivamente sobre la producción de hidrógeno, esta característica se evidenció en el montaje 2 al cual se adicionaron nutrientes presentando de esta manera mejores resultados.
- De acuerdo con la revisión bibliográfica, se puede concluir que la producción de hidrógeno por procesos fermentativos genera una mayor tasa en comparación con los demás métodos.
- La mejor alternativa entre los montajes desarrollados es el número 2, esto se evidencia en el comportamiento de la DQO y AVT, donde para dicho experimento la DQO disminuye poco y los AVT aumentan considerablemente, siendo estas condiciones favorables para la producción de hidrógeno.

5.2. PERSPECTIVAS

- Identificar el reactor que bajo diferentes configuraciones permita evaluar la generación de hidrógeno de manera óptima.
- Estudiar diferentes concentraciones del sustrato y del inóculo con el fin de evaluar los diferentes efectos que se pueden presentar en el desarrollo del proceso

- Producir hidrogeno en periodos cortos a partir de aguas residuales provenientes de industrias alimentarias.
- Desarrollar métodos de pre-tratamiento más eficientes para la inoculación de las aguas.
- Generar un aprovechamiento adecuado de los subproductos para que la producción de hidrógeno se maneje de manera sostenible económica y ambientalmente.
- De acuerdo con los resultados obtenidos el agua residual de Bavaria es una opción viable para el desarrollo de nuevos experimentos con diferentes inóculos, desarrollando un mejor desarrollo del tema en el campo investigativo.
- El experimento realizado de acuerdo con las condiciones establecidas permitió obtener hidrógeno fermentativo el cual se recomienda para futuros proyectos cuantificar mediante cromatografía de gases.

6. BIBLIOGRAFÍA

Anukard's Weblog. (26 de Agosto de 2012). Obtenido de Diferentes métodos de obtención de hidrógeno a partir del agua-Biológico, Químicos. Físicos, Bioquímicos, etc. : <http://arukard.wordpress.com/2008/04/19/diferentes-metodos-de-obtencion-de-hidrogeno-apartir-del-agua-biologicos-quimicos-fisicos-bioquimios-etc/>

Aispuro Castro, K. (2011). *Determinación de los flujos metabólicos en la producción de hidrógeno*. Instituto Politecnico nacional. Unidad profesional interdisciplinaria de Biotecnología., México D.F.

APHA . (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater* (Vol. 16). Washington DC, USA: American Public Health Organization .

Argun , H., & Kargi , F. (2011). Bio - Hydrogen production by different operational modes of dark and photo - fermentation: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy* , 36, 7443-7459.

Bedoya, a., Castrillón, J., Ramirez, J., Vásquez, J., & Arias, M. (2008). Producción biológica de hidrógeno: Una aproximación al estado del arte. *Dyna*(154), 137-157.
Bisaillon, A., Turcot, J., & Hallenbeck, P. C. (2006). The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 1504-1508.

Buitrón, G., & Carvajal, C. (2009). Producción de hidrógeno a partir de aguas residuales. *Revista digital universitaria UNAM*, 10(8), 1-9.

Chang, F.-Y., & Lin, C.-Y. (2004). Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *International journal of Hydrogen Energy*, 29, 33-39.

Chang, J.-S., Wu, K.-j., & Chang, C.-F. (2007). Simultaneous production of biohydrogen and bioethanol with fluidized bed and packed bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge.

Chen , W. M., Tseng , Z. J., Lee , K. S., & chang , J. S. (2005). Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge . *International Journal of Hydrogen Energy* , 30, 1063-1070.

Chernicharo, C. A. (2007). *Principios do tratamento biológico de águas residuárias. Reactores anaeróbios*. Brasil: Universidad Federal de Minas Gerais. Dep. de Engenharia Sanitária e Ambiental .

Daday, A., Platz, R., & Smith, G. (2007). Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge . *Bioresource Technology* , 98, 1183-1190.

Davila Vazquez , G., Arriaga , S., Alatraste Mondragon , F., de León Rodriguez , A., Rosales Colunga , L., & Razo Florez , E. (2007). Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. *Environmental Science and Biotechnology*, 7, 27-45.

Dutta, D., De, D., Chauduri, S., & Bhattacharya, S. (2005). *Hydrogen production by Cyanobacteria. Review*. Obtenido de Microbial Cell Factories.: <http://www.microbialcell-factories.com/content/4/1/36>.

E, F. (s.f.).

Eroglu, E., Eroglu, I. G., Turker, L., & Yucel, M. (2006). Biological hydrogen production from olive mill wastewater with two-stage processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 1527-1535.

Etchebehere Arenas, C., Soares Fernandes, B., Castelló Antonaz, E. V., Foresti, E., Peixoto, G., Borzacconi, L. M., y otros. (s.f.). Producción de biohidrógeno a partir de aguas residuales para ser utilizado como fuente de energía. En UNESCO, & I. C. Organización de las Naciones Unidas para la Educación (Ed.), *Biocombustível para o Mercosul* (Vol. 9o andar). Brasília: CNPq/IBICT/UNESCO.

Fang H, H. P., & Liu , H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*, 1, 87-93.

Fang, H., Lin, C., & Zhang, T. (2006). Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 683-692.

Franchi, E., Tosi, C., Scolla, G., Penna, G., Rodriguez, F., & Pedroni, M. (2004). Metabolically engineered *Rhodobacter Sphaeroides* RV strains for improved biohydrogen photoproduction combined with disposal of food wastes. *Marine Biotechnology*, 6, 552-565.

Gavala, H., Skiadas, I., & Ahring, B. (2006). Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 1164-1175.

Gilroyed, B., Chang, C., Chu, A., & Hao, X. (2008). Effect of the temperature on anaerobic fermentative hydrogen gas production from feedlot cattle manure using mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4301-4308.

Gujer, W., & Zehnder, A. (1983). Conversión process in anaerobic digestion. *Wat. Sci. Technol*, 15, 127-1162.

Hallenbeck, P. C. (2005). Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Science and Technology*, 52, 21-29.

Hallenbeck, P. C., & Beneman, J. R. (2002). Biological hydrogen production, Fundamental and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1185-1193.

Hallenbeck, P. C., & Ghosh, D. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology*, 27, 287-297.

Hawkes, I. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L., & Hussy, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production challenges for process optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1339-1347.

Hillmer, P., & Gest, H. (1977). H₂ metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*: H₂ production by growing cultures. *Journal of Bacteriology*, 129(2), 724-731.

Jorquera, O., Hernández, J., & Herrera, L. (2003). *Producción biofotolítica de hidrógeno*. Departamento de Ingeniería Química. Obtenido de Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile : Disponible:<http://cabierta.uchile.cl/revista/16/articulos/pdf/paper5.pdf>.

Kapdan, I., & Kargi, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials . *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 569-582.

Kawagoshi , Y., Hino, N., Fujimoto , A., Nakao , M., Fujita , Y., Sugimura , S., y otros. (2005). Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 100(5), 524-530.

Kondo, T., Arakawa, M., Hirai, T., T, w., Hara, M., & J, M. (2002). Enhancement of hydrogen production by a photosynthetic bacterium mutant with reduced pigment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(2), 145-150.

Kovács, K., Maróti, G., & Rákhely, G. (2006). A novel approach for biohydrogen production. *International Journal of Hidrogen Energy*, 31, 1460-1468.

Kruse, O., Rupprecht, J., Bader, K., Thomas-Hall, S., Schenk, P., Finazzi, G., y otros. (2005). Improved photobiological H₂ production in engineering green algal cells. *journal of Biological Chemistry*, 280(40), 34170-34177.

Laborde , M. A., & Rubiera González , F. (2010). *La Energía del Hidrógeno . Argentina : Ediciones CYTED.*

Lay, J. J. (2000). Modeling and optimization of anaerobic digestion sludge converting starch to hydrogen . *Biotechnol. Bioeng*, 68, 269-278.

Lee, K. s., Lin , P. J., & Chang , J. S. (2006). Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. *International Journal of Hydrogen Energy* , 31, 465-472.

Lee, K. S., Lin, P. J., & Chang, J.-S. (2006). Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 465-472.

Lee, K.-S., & Lo, Y.-S. L.-C.-J.-S. (2004). Operation strategies for biohydrogen production with a high-rate ananerobic granular sludge bed bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 605-612.

Lettinga , G. (1995). Anaerobic digestion and wastewater treatment systems . 67, 3-28.

Levenspiel , O. (2000). *Chemical reaction engineering*. New york: John Wiley & Sons Inc. .

Levin , D., Pitt, L., & Love , M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application . *International Journal of Hydrogen Energy* , 29, 173-185.

Li, C., & Fang, H. (2007). Inhibition of heavy metals on fermentative hydrogen production by granular sludge. *Chemosphere*, 67, 668-673.

Lin , C. Y., & Chang, R. C. (2004). Fermentative hydrogen production at ambient temperature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 715-720.

Lin , C. Y., & Chen, H. P. (2006). Sulfate effect on fermentative hydrogen production using anaerobic mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 953-960.

Lin , C. Y., & Lay, C. H. (2004). Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora . *International Journal of Hydrogen Energy* , 29, 42-45.

Lin, C. Y., & Lay, C. H. (2005). A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30, 285-292.

Lin, C. Y., Wu, C. C., & Hung, C. H. (2008). Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 43-50.

Lloyd , T. A., & Wyman , C. E. (2005). Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids . *Bioresourse Technology* , 96, 1967-1977.

Melis , A., & Happe, T. (2001). Hydrogen production. Green algae as source of energy. . *Plant Physiology.*, 127, 740-748.

Mu, Y., Zheng, X. J., Yu, H. Q., & Zhu, R. F. (2006). Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 780-785.

Nath, K., & Das, D. (2004). Improvement of fermentative hydrogen production: Various approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 520-529.

Noike , T., & Mizuno , O. (2000). Hydrogen fermentation of organic municipal wastes . *Water Science Technology* , 42, 155-162.

Ntaikou , I., Antonopoulou , G., & Lyberatos , G. (2010). Biohydrogen production from biomass and wastes vis dark fermentation: A review. *Waste and Biomass Valorization*, 1, 21-39.

O'Flaherty, V., Collins , G., & Mahony, T. (2006). The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatmen. *Environmental Science and Bio Technology*, 5, 39-55.

Okamoto , M., Miyahara , T., Mizuni , O., & Noike , T. (2000). Biological hydrogen potential of materials characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes. *Water Science Technology* , 41, 25-32.

O-Thong, S., Prasertsan, P., Karakashev, D., & Angelidaki, I. (2008). Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum PSU-2. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1204-1214.

Pallavi, S., & Pandey, A. (2011). An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 7460-7478.

Peixoto, G. (2008). *Producción de hidrógeno en reactor anaerobio de lecho fijo de flujo ascendente a partir de agua residual de industria de refrigerantes*. San Carlos, Brasil: Universidad de Sao Paulo.

Redwood, M., & Macaskie, L. (2006). A two-stage, two-organism process for biohydrogen from glucose. *International Journal of hydrogen Energy*, 31, 1514-1521.

Reith, J., Wijffels, R., & Barten, H. (2003). Bio-methane & Bio-hydrogen status and perspectives of biological methane and hydrogen production . *Dutch Biological Hydrogen Foundation*.

Rogers, P., & Gottschalk, G. (1993). Biochemistry and regulation of acid solvent production in clostridia. 25-50.

Show, K.-Y., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2011). Bioreactor and process desing for biohydrogen production. *Bioresourse Technology*, 102, 8524-8533.

Sinha, P., & Anjana, P. (2011). An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *Internacional Journal of Hydrogen Energy*, XXX, 1-19.

Soares Fernandes, B. (2008). *Produção de hidrogenio em reactor anaerobio de leito fixo* . Sao Carlos : Universidade de Sao Paulo .

Soares, B., Peixoto, G., Rui, F., Saavedra del Aguila, N., & Zaiat, M. (2010). Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. *Energy for Sustainable Development*, 14, 143-148.

Speece , R. E. (1983). Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environmental Science & Technology* , 17, 416-427.

Stenerson , K. (2004). *Analysis of permanent gases* (Vol. 3). The reporter.

Stoklusa, D. N., Diaz , L. A., & Abuin, G. C. (5 de Septiembre de 2012). Obtenido de Materiales lectrocatalíticos para producción de hidrógeno por electrólisis de agua en medio alcalino: http://www.cab.cnea.gov.ar/ieds/hyfuseen_2011/extras/libro/stoklosa_d_n_06_227.pdf

Vaceque Acosta, J., Villalba , F., & Yuruhan Cabello , S. (2010). Producción biológica de hidrógeno: Fotofermentación y fermentación oscura. Diferencia

principales variables. En G. Riveros Godoy, *Tecnología del hidrógeno. Compendio de trabajos*. (págs. 33-36). San Lorenzo- Paraguay: Universidad nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Químicas .

Valdez , I., Ríos , E., Esparza, F., Cecchi, F., & Poggi, H. (2005). Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30, 1383-1391.

Valdez vazquez , I., Sparling , R., Risbey , D., Rinderknecht , S. N., & Poggi Varaldo , H. M. (2005). Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastes . *Bioresourse Technology* , 96, 1907-1913.

Vignais, P., Magnin, J.-P., & Willison, J. (2006). Increasing biohydrogen production by metabolic engineering. 31, 1478-1483.

Vijayaraghavan, K., & Soom , M. A. (2004). Trends in biological hydrogen production: A review. *International Journal of Hidrogen Energy* .

Wang, J., & Wan, W. (2008). Effect of Fe²⁺ concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 1215-1220.

Wang, J., & Wan, W. (2008). Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 5392-5397.

Wang, J., & Wan, W. (2009). Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 235-244.

Wang, J., & Wan, W. (2009). Optimization of fermentative hydrogen production process using genetic algorithm based on neural network and response surface methodology. *International Journal of Hidrogen Energy*, 34, 255-261.

Wang, J., & Wan, W. (2009). Optimization of fermentative hydrogen production process using genetic algorithm based on neural network and response surface methodology. *International Jorunal of Hydrogen Energy*, 34, 255-261.

Wang, L., Zhou, Q., & Li, F. (2006). Avoiding propionic acid accumulation in the anaerobic process for biohydrogen production. *Biomass and Bioenergy*, 30, 177-182.

Weissman , J., & Benemann, J. (1977). *Hydrogen production by nitrogen-starved cultures of Anabaena cylindrica*. *Applied and Environmental Microbiology*.

Wolfrum, E., & Weaver, P. (2000). *Bioreactor development for biological hydrogen production*. Proceeding of the 2000 DOE Hydrogen Program .

Wu, K.-J., & Chang, J.-S. (2007). Batch and continuous fermentative production of hydrogen with anaerobic sludge entrapped in a composite polymeric matrix. *Process Biochemistry*, 42, 279-284.

Wu, S.-Y., Lin, C.-N., & Chang, J.-S. (2005). Biohydrogen production with anaerobic immobilized by ethylene-vinyl acetate copolymer. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30, 1375-1381.

Yang, H., Shao, P., Lu, T., Shen, J. W., Xu, Z., & Yuan, X. (2006). Continuous biohydrogen production from citric acid wastewater via facultative anaerobic bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 1306-1313.

Zhang , T., Liu, H., & Fang , H. (2003). Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition . *Journal of Environmental Management* , 69, 149-156.

Zhang , Y., & Shen , J. (2005). Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31, 441-446.