



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Energía Renovable

“EVALUACIÓN DE UN REACTOR CONTINUO DE TANQUE AGITADO (RCTA) PARA LA GENERACIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCOSA Y TIEMPOS DE RETENCIÓN HIDRÁULICA”

Tesis que presenta

I.Q. ANDRÉS GUERRERO ÁLVAREZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida Yucatán, México. Agosto de 2011

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó, para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades, Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. Y que dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Mérida Yucatán, México. Agosto de 2011

Andrés Guerrero Álvarez

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LA UNIDAD DE ENERGÍA RENOVABLE DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN A.C., BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. LILIANA M. ALZATE GAVIRIA Y BAJO LA CODIRECCIÓN DEL DR. JAVIER O. MIJANGOS CORTÉS.

Dr. Oscar Moreno Valenzuela

A mis padres Lorena Álvarez Gómez y Andrés Guerrero Jiménez, a mis hermanos Julio Cesar y Cinthia Monserrat Guerrero Álvarez que de muchas maneras forman parte de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la Dra. Liliana Alzate Gaviria por su guía y apoyo en la elaboración de esta tesis.

De igual manera me gustaría agradecer a mi codirector el Dr. Javier O. Mijangos Cortés quien de muchas maneras expresó su apoyo para el desarrollo de este trabajo de investigación.

A mi asesora externa, parte importante de mi comité la M.C. Alicia Cardoz por sus siempre acertados consejos, recomendaciones y puntos de vista que forman parte de este trabajo de tesis.

Al M.C Jorge Domínguez Maldonado quien forma parte importante del desarrollo de este trabajo, gracias a su vasto conocimiento, gran sentido de cooperación y apoyo se realizó la parte experimental de este trabajo de investigación.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Y en especial a la unidad de Energía Renovable, por proporcionar las facilidades para desarrollar este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca No. 224329 otorgada

A mis compañeros quienes hicieron que el trabajo de laboratorio fuera ameno y agradable.

ÍNDICE

	Pag.
Índice	I
Índice de tablas	III
Índice de figuras	IV
Resumen	V
Abstract	VI
Introducción y objetivos	1
1. Antecedentes	7
1.1. Producción de hidrógeno mediante fermentación	8
1.2. Bioquímica de la producción de hidrógeno	9
1.2.1. Rutas metabólicas	10
1.2.2. Hidrogenasa	11
1.2.3. Bacterias productoras de hidrógeno predominantes en los cultivos mixtos	13
1.3. Fermentación propiónica	15
1.4. Fermentación etílica	17
1.5. Fermentación butírica	19
1.5.1. Efectos de la concentración de sustrato en la fermentación butírica	20
1.5.2. Influencia del pH	22
1.5.3. Mecanismos para prevenir la producción de metano	23
1.5.4. Efectos del TRH sobre la producción de hidrógeno y la comunidad microbiana	26
1.6. Hipótesis	29
2. Metodología	30
2.1. Ensamblado del reactor y condiciones de operación	31
2.2. Control del nivel de volumen de operación del reactor	34
2.3. Agua residual sintética	35
2.4. Inóculo	36
2.5. Diseño de los experimentos	36

2.5.1. Parámetros evaluados	37
3. Resultados y discusión	38
3.1. Desempeño del RCTA a diferentes concentraciones de sustrato	39
3.2. Desempeño del RCTA operado a diferentes tiempos de retención hidráulica	45
Conclusiones	51
Bibliografía	53

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1.1 Oxidación de NADH de la fermentación a partir de la glucosa y producción de H ₂ y ATP.	17
Tabla 1.2 Rendimiento de hidrógeno a diferentes condiciones de operación en reactores RCTA.	23
Tabla 1.3 Pretratamientos realizados a inóculos de procedencia anaerobia para la inhibición de la generación de metano y rendimiento de hidrógeno.	25
Tabla 2.1 Composición del agua residual sintética utilizada para la alimentación del reactor durante el desarrollo de los experimentos.	35
Tabla 3.1 Resultados obtenidos en el experimento a diferentes concentraciones de sustrato.	40
Tabla 3.2 Resultados obtenidos en el experimento a diferentes tiempos de retención hidráulica.	49

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1.1	Etapas de la digestión anaerobia. 9
Figura 1.2	Ruta bioquímica de la acidogénesis de la glucosa. 11
Figura 1.3	Análisis del efecto de diferentes TRH sobre la tasa de producción de hidrógeno. 27
Figura 2.1	a) Pruebas de estanqueidad b) RCTA ensamblado con periféricos de control in situ. 31
Figura 2.2	Esquema del contenedor de acrílico 33
Figura 2.3	a) Esquema del PLC 707 utilizado para la automatización del gasómetro b) Sistema completo de medición de biogás 33
Figura 2.4	a) Esquema del circuito electrónico del control de bombas b) Esquema del medidor de nivel ya instalado en el interior del reactor. 34
Figura 2.5	a) Tiempos de retención de los AGV y etanol b) Tiempo de retención del hidrógeno. 37
Figura 3.1	Efecto del aumento de la concentración de sustrato sobre el rendimiento de hidrógeno y la distribución de los metabolitos solubles producidos. 43
Figura 3.2	Efecto del aumento de la concentración de sustrato sobre la producción de metabolitos solubles en el efluente 44
Figura 3.3	Efecto del TRH sobre el rendimiento de hidrógeno y la distribución de los metabolitos solubles producidos durante la fermentación a 80 d DQO/L. 46
Figura 3.4	Efecto de la variación del TRH sobre la producción de etanol y la glucosa convertida. 48

RESUMEN

El efecto de la concentración de sustrato y el tiempo de retención hidráulica (TRH) sobre la producción de hidrógeno, fue investigado en un reactor RCTA (Reactor Continuo de Tanque Agitado) usando agua residual sintética con glucosa como fuente de sustrato, e inoculado con un cultivo mixto. En este trabajo se estableció satisfactoriamente el metabolismo bacteriano para la fermentación butírica cuando el reactor fue operado a 10 g DQO/L, $35 \pm 1^\circ \text{C}$, $\text{pH } 5.5 \pm 0.1$, 190 rpm y 9 h de TRH, obteniendo un rendimiento de hidrógeno de 2.7 mol H_2 /mol glucosa además de ácido butírico y ácido acético como principales metabolitos solubles. Sin embargo, cuando la concentración de sustrato fue aumentada a 80 g DQO/L, se observó una reducción en el rendimiento de hidrógeno el cual fue de 2.0 mol H_2 /mol glucosa, mientras que la producción de ácido propiónico y etanol bajo las nuevas condiciones aumentaron de valores trazas a 11915.3 y 11959.6 mg/L, respectivamente. Lo cual indicó que la fermentación butírica fue inhibida prevaleciendo las fermentaciones propiónica y etílica.

Con el objetivo de reducir la producción de ácido propiónico y etanol, y a su vez incrementar el rendimiento de hidrógeno en el sistema, se evaluaron tres TRH (6, 9 y 12 h) a una concentración de sustrato de 80 g DQO/L. El máximo rendimiento de hidrógeno se obtuvo a 9 h y el mínimo a 12 h. La distribución del ácido propiónico dentro de los metabolitos solubles indicó que fue el principal producto, seguido de la producción de etanol, por lo que se presume que la variación del TRH no mostró tener efecto sobre el metabolismo bacteriano, y que la variación en el rendimiento de hidrógeno se debe presumiblemente a la variación en la población bacteriana.

ABSTRACT

The effect of substrate concentration and Hydraulic Retention Time (HRT) on hydrogen production was investigated in a CSTR reactor (continuous stirred tank reactor) using synthetic wastewater with glucose as substrate, and inoculated with a mixed culture. In this work, the bacterial metabolism for butyric fermentation was successfully established when the reactor was operated at 10 g COD/L, 35 ± 1 °C, pH 5.5 ± 0.1 , 190 rpm and 9 h of HRT, obtaining a hydrogen yield of 2.7 mol H₂/mol glucose and butyric and acetic acid as the main soluble metabolites. However, when the substrate concentration was increased to 80 g COD/L, there was a reduction of hydrogen yield to 2.0 mol H₂/mol glucose while the production of propionic acid and ethanol under the new conditions increased from traces to 11915.3 and 11959.6 mg/L, respectively. This indicates that butyric fermentation was inhibited in favor to propionic acid and ethanol fermentation.

In order to reduce the production of propionic acid and ethanol, and increase the hydrogen yield in the system, three HRT (6, 9 and 12 h) were evaluated at a substrate concentration of 80 g COD/L. The maximum hydrogen yield was obtained at 9 h and the minimum at 12 h of HRT. The distribution of propionic acid into the soluble metabolites indicated that it was the main product, followed by the production of ethanol, so it can be supposed that the variation of HRT showed no effect on bacterial metabolism, and that the variation on the hydrogen yields is presumably due to a variation in the bacterial population.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Situación actual del recurso energético

El mundo se interesa nuevamente por el sector más grande de la economía mundial, el energético, las razones de este interés son diversas: propiamente energéticas, pero también ambientales y tecnológicas [1]. En 1999 la Organización para la Cooperación Económica y Ambiental (OECD por sus siglas en inglés) en su comunicado “Energy: The next fifty years” [2], advirtió de la reducción en la producción convencional del petróleo y el surgimiento de nuevas tecnologías energéticas para el 2010/2020, por otro lado el Fondo de Población de las Naciones Unidas (UNFPA por sus siglas en inglés) publicó en su comunicado “Estado de la Población Mundial 2009” [3], las proyecciones de la población mundial para el 2050, que según la hipótesis de la División de Población, Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de las Naciones Unidas habrán en el planeta aproximadamente 8,000 millones de personas. Lo que trae como consecuencia el crecimiento de la demanda mundial de energía primaria, se pretende que los combustibles fósiles se mantengan como la principal fuente energética de aquí al año 2030 sosteniendo el 90% de ese crecimiento, según la Agencia Internacional de Energía [1], y aunque la incertidumbre es considerable, en el mundo existe un grado de temor del consenso energético para los próximos 20 años [2].

El crecimiento de nuestro país se ha y seguirá basado en la economía energética fósil, [1] y a pesar de contar con reservas de petróleo, debemos impulsar el uso de alternativas, aprovechando el importante potencial que tenemos para la generación de energía a partir de fuentes como la solar, la eólica, la minihidráulica y la biomasa, apoyando así la conservación ambiental de nuestro planeta [4], y reduciendo las emisiones de gases de efecto invernadero.

Energías renovables

Ningún plan de reducción sustancial de las emisiones con efecto invernadero tendrá éxito si se funda sólo en el aumento de la eficiencia energética, las emisiones de carbono seguirán en aumento a pesar de la introducción de vehículos, edificios y equipos que alcancen mayor rendimiento energético [5].

El aprovechamiento de los biocombustibles por otro lado, no implica un aumento neto de dióxido de carbono a la atmósfera, ya que éstos representan un ciclo cerrado de emisión y captura de CO₂ [5]. Tal efecto neutro, es la principal ventaja del uso de la biomasa como fuente de energía puesto que contribuye a minimizar el efecto de los gases de invernadero [6].

Biomasa; Fuente renovable de energía

Actualmente en nuestro país existen procesos para tratamiento de biomasa residual, pero no son precisamente para la producción de combustibles, como es el caso de los tratamientos de aguas residuales agrícolas, municipales o industriales, a pesar de que éstas representan una fuente potencial de energía renovable por su gran contenido de compuestos orgánicos [7].

Alrededor del mundo se han desarrollado procesos para la producción de combustibles o compuestos químicos a partir de biomasa disuelta en aguas residuales, por ejemplo, la tecnología del biogás –mediante digestión anaerobia-, ha sido ampliamente utilizada por sus beneficios, entre ellos, el hecho de ser una fuente de energía económica que ha permitido reducir costos asociados al consumo de energía eléctrica o sistemas de gas convencionales [7-10].

De igual forma, la posibilidad de obtener hidrógeno a partir de biomasa es particularmente atractiva, ya que éste es postulado como un vector energético en sustitución de combustibles fósiles [2, 11].

Tecnología del hidrógeno.

La rápida evolución de la tecnología de las celdas de combustibles ha abierto una oportunidad al hidrógeno para convertirse en una alternativa energética viable [12]. La comisión Europea y los Estados Unidos sugieren que el hidrógeno será la base para la nueva economía energética [11, 13]. Si el hidrógeno es introducido dentro del sistema

energético, el costo para reducir una unidad de CO₂ bajaría alrededor de un 4% en el 2030 y 15% en el 2050, lo que implica que el hidrógeno es una opción costo-efectivo para la reducción de CO₂ debido a que puede convertirse en energía eléctrica y calorífica con alta eficiencia y cero emisiones [11].

Además el hidrógeno se puede producir de la electrólisis del agua con electricidad renovable, directamente de energía solar a través de fotoelectrólisis, de biomasa seca mediante gasificación y de residuos orgánicos disueltos (aguas residuales) mediante fermentación y de celdas de electrólisis biocatalizadas. Todas estas tecnologías pueden trabajar juntas complementándose unas a otras creando mucha más flexibilidad en el suministro de hidrógeno [7].

Producción biológica de hidrógeno mediante fermentación.

La producción de hidrógeno mediante fermentación, usando cultivos mixtos a temperaturas de mesofilia, puede ser posicionada como una tecnología de desarrollo comercial.

En la literatura se ha reportado ampliamente el uso de cultivos mixtos productores de hidrógeno, los cuales, obtenidos de fuentes naturales, son capaces de sobrevivir en sustratos no estériles. Estos consorcios microbianos contienen principalmente bacterias del género *Clostridium* tales como *C. butyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. tyrobutylicum*, entre otras, éstas en respuesta a condiciones ambientales extremas, forman esporas resistentes a altas temperaturas, algunos agentes químicos y tipos de radiación como el ultravioleta. Esta habilidad de formar esporas es usada para la selección del *Clostridium* en los cultivos mixtos para la producción de hidrógeno. Sin embargo, una desventaja de esta bacteria es la sensibilidad a condiciones inestables de temperatura, pH o sustrato, puesto que estas son importantes para la germinación o evitar que vuelvan a esporular durante el proceso de producción [14-18].

Es importante que las condiciones ambientales de operación del reactor permitan la producción de hidrógeno sin metano o solventes, pero es aún mas importante, operar el reactor bajo condiciones que permitan obtener el máximo rendimiento de hidrógeno (4 mol

H₂/mol glucosa), ya que la producción de metano, ácido propiónico y solventes como el etanol, reducen la eficiencia de los reactores, puesto que dichas moléculas requieren de iones H⁺ para su formación.

La concentración de sustrato es un parámetro importante en el estudio de los bioreactores productores de hidrógeno. Diversos estudios se han desarrollado para definir el intervalo de carga orgánica que un sistema puede procesar efectivamente y obtener un máximo rendimiento de hidrógeno [19]. Otros parámetros ampliamente estudiados son el pH y el Tiempo de Retención Hidráulica (TRH), estos están relacionados con la eficiencia del reactor porque influyen en la producción de metano, ácido propiónico y etanol. Muchos de los estudios realizados con sustratos disueltos, han reportado que a pH entre 4.5 y 6.7 [20-22] y tiempos de retención hidráulica entre 8 y 12 h la producción de hidrógeno se puede llevar a cabo sin producción de metano [14, 23].

Así en este estudio se observó el efecto de variar el TRH a altas concentraciones de sustrato en un reactor continuo de tanque agitado, de igual forma se desarrollaron periféricos de control automático, que permiten mantener una producción en continuo sin variar los niveles en el reactor. Los datos obtenidos nos proporcionan información del comportamiento de un sistema de producción de hidrógeno operado a altas concentraciones de sustrato con un cultivo mixto natural y de la región.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar las condiciones adecuadas de operación en un RCTA a altas concentraciones de sustrato para la producción de hidrógeno evaluando dos concentraciones de sustrato (azúcar estándar de caña) y tres tiempos de retención hidráulica.

Objetivos específicos

1. Evaluar el desempeño de un reactor acidogénico con dos concentraciones de sustrato, 10 y 80 g DQO/l.
2. Evaluar el desempeño de un reactor acidogénico con tres tiempos de retención hidráulica de 6, 9 y 12 horas operado a 80 g DQO/L.
3. Diseñar y ensamblar sistemas de control del nivel, temperatura, pH y velocidad de agitación para un RCTA.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES

1.1. Producción de hidrógeno mediante fermentación

El interés en la aplicación industrial de microorganismos para generar fuentes prometedoras de energía, surgió a principio de los años 70's como resultado de la escases del petróleo en Estados Unidos [24]. Desde hace ya casi 100 años existen registros de observaciones de producción de hidrógeno con microalgas y bacterias [25], pero fue hasta los años 80's, cuando algunos investigadores iniciaron estudios sobre la producción de hidrógeno con cultivos puros de bacterias anaerobias [21], sin embargo, la producción de hidrógeno mediante cultivos mixtos (consorcios microbianos) ha atraído más la atención de los investigadores [16]. En este ámbito, los ingenieros están interesados en usar cultivos mixtos [26], puesto que son procesos que no requieren esterilización, lo cual significa un ahorro económico [27], son fáciles de controlar (sistemas prácticos) y sumado a ello, podemos mencionar que se tendría una amplia gama de materias primas a tratar [26].

La producción de hidrógeno mediante fermentación puede llevarse a cabo sin necesidad de proveer energía luminosa, lo cual lo hace económicamente viable. Actualmente es una tecnología ampliamente estudiada, y se han evaluado distintos parámetros con el objetivo de encontrar las condiciones adecuadas que proporcionen los máximos rendimientos [14, 26, 28].

El uso de residuos orgánicos en lugar de carbohidratos puros es la principal ventaja del proceso fermentativo utilizando cultivos mixtos, además de que los costos de escalamiento son relativamente bajos. Así, es posible generar hidrógeno a partir de aguas residuales municipales, industriales, agrícolas, residuos sólidos, evitando su incineración o acumulación en rellenos sanitarios [27].

1.2. Bioquímica de la producción de hidrógeno

La digestión anaerobia ha sido usada por años en plantas de tratamiento de aguas residuales, y ésta ha sido un técnica atractiva que ha fomentado la reducción de lodos y la producción energía mediante la producción de gas metano [29], pero el metano y su principal producto de combustión (CO_2) son gases de efecto invernadero [30]. Sin embargo el hidrógeno es un combustible limpio [31] el cual es posible obtener en la etapa de acidogénesis de la digestión anaerobia [30] (Figura 1.1).

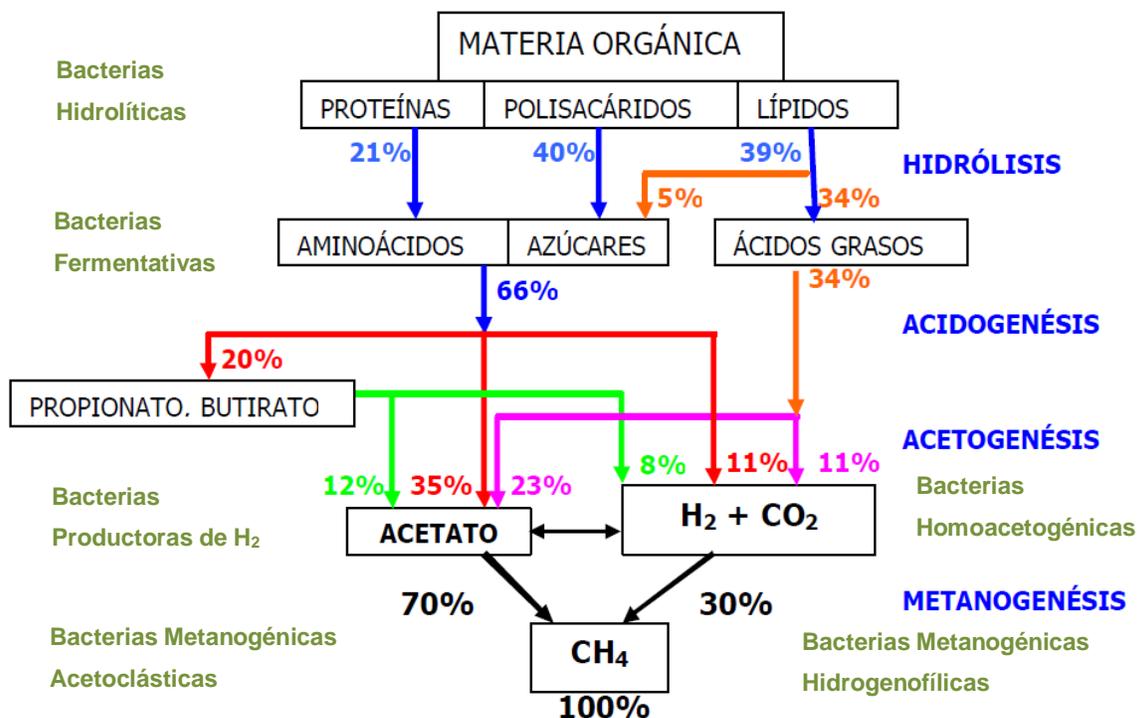


Figura 1.1 Etapas de la digestión anaerobia [32].

Bajo este concepto se han realizado estudios de tratamiento de aguas residuales mediante digestión anaerobia en dos etapas con reactores separados, en el cual, la hidrólisis y la acidogénesis son conducidas en el primer reactor bajo condiciones

favorables a las bacterias fermentativas y acidogénicas. El efluente ácido es subsecuentemente tratado en un reactor metanogénico [33]. Así, en ausencia de oxígeno, en un reactor acidogénico y durante las dos primeras etapas de la digestión anaerobia, se lleva a cabo la conversión de la materia orgánica a ácidos grasos volátiles, hidrógeno y CO_2 [10].

En la primera etapa; la hidrólisis, las bacterias hidrolíticas descomponen moléculas como proteínas y lípidos, en moléculas de bajo peso molecular como azúcares, aminoácidos y ácidos grasos [13, 14].

Posteriormente, en la segunda etapa, las bacterias acidogénicas se encargan de fermentar dichas moléculas a ácidos grasos de bajo peso molecular, como ácido acético, fórmico, propiónico y butírico, además de etanol, H_2 y CO_2 [35].

1.2.1. Rutas metabólicas.

Algunas rutas han sido propuestas para la producción de hidrógeno mediante bacterias fermentativas durante la acidogénesis. La Figura 1.2 muestra la ruta de la fermentación mediante el uso de glucosa como modelo de sustrato [36]. Primero, la glucosa es convertida a piruvato mediante glicólisis, produciendo Adenosina Trifosfato (ATP) a partir de Adenosina Difosfato (ADP) y Nicotidamida Adenina Dinucleotido (NADH) [37], en esta fase el exceso de equivalentes reductores (H^+) es contrarrestado por la célula, mediante la producción de NADH, por lo que a mayor concentración de (H^+), mayor será la concentración de NADH. La producción de hidrógeno es el método de la célula para reducir la acumulación de NADH, y esta reacción ($2\text{NADH} + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2 + 2\text{NAD}^+$) es catalizada por la hidrogenasa [38].

Posteriormente el piruvato es convertido a acetilcoenzima A (Acetil CoA), dióxido de carbono (CO_2) e hidrógeno (H_2) mediante la piruvato-ferrodoxina-oxidoreductasa e hidrogenasa [26]. Finalmente el Acetil CoA es convertido a acetato, butirato y etanol, dependiendo del microorganismo involucrado y las condiciones ambientales del proceso. El NADH que no fue oxidado en la producción de hidrógeno es utilizado para la formación

de butirato y etanol. En la producción de butirato a partir del Acetil CoA se produce ATP [36].

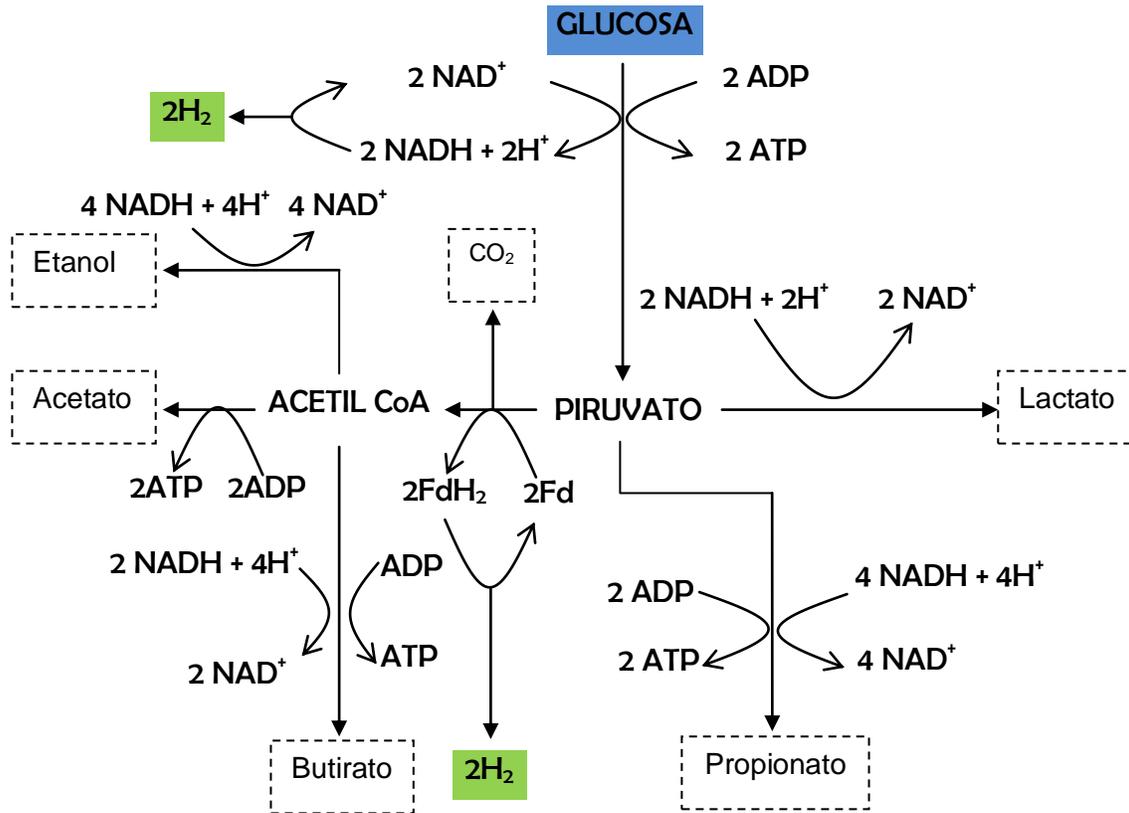


Figura 1.2 Ruta Bioquímica de la acidogénesis de la glucosa. Adaptación de [37].

1.2.2. Hidrogenasa.

La producción de hidrógeno es un mecanismo específico que dispone del exceso de electrones, a través de la actividad de la hidrogenasa en bacterias fermentativas [26]. La hidrogenasa se ha considerado la clave para tal proceso biológico [39], es una enzima del tipo metal-oxido-reductora, que cataliza tanto de manera reversible como irreversible la conversión de hidrógeno en sus constituyentes, dos protones y dos electrones, lo cual

depende de las condiciones ambientales en las que se encuentre, la función metabólica y específicamente las oxido-reductoras asociadas [28, 40].

Las hidrogenasas son grupos de enzimas de diferentes tamaños, composición de subunidades y localización celular [28, 41]. Las enzimas ubicadas en el citoplasma se encargan de remover el exceso de reductores equivalentes, mientras que la función de las enzimas ubicadas en el periplasma es la de oxidar hidrógeno [28]. La presencia del ion metálico varía con respecto a la localización celular [28, 42] y dependiendo del metal contenido en la subunidad catalítica, la hidrogenasa puede ser clasificada en tres categorías [28]: [FeFe]-hidrogenasa, [NiFe]-hidrogenasa y [NiFeSe]-hidrogenasa [43-46].

La [FeFe]-hidrogenasa citoplásmica es la que cataliza el proceso de producción de hidrógeno molecular, mientras que la [NiFe]-hidrogenasa y [NiFeSe]-hidrogenasa ubicadas en el periplasma lo disocia en protones [28, 45, 47]. La [FeFe]-hidrogenasa es usualmente 10 órdenes de magnitud más activa que las [NiFe]-hidrogenasa [47, 48] y se encuentra involucrada directa o indirectamente en el metabolismo energético [28]. Durante la oxidación de la materia (fermentación), la hidrogenasa transfiere electrones de la Ferredoxina reducida (Fd_{red}) o NADH a protones, para regresarlos a su forma oxidada, Ferredoxina oxidada (Fd_{ox}) y Nicotidamida Adenina Dinucleotido oxidada (NAD^+). Lo cual es requerido para que la glucólisis y descarboxilación del piruvato pueda proceder a generar ATP [49].

La hidrogenasa es encontrada en una gran variedad de microorganismos incluyendo los anaerobios fermentativos, cianobacterias [50, 51], sulfato reductoras [50, 52], algas [50, 53], rizobios [50, 54] y arqueas [50, 55]. Es sensible al oxígeno, por lo tanto, es un importante factor en la producción anaeróbica de hidrógeno [56]. Para muchas bacterias productoras de hidrógeno, la presencia de oxígeno disuelto puede inhibir por completo la producción de hidrógeno [50]. De igual forma se ha reportado que es inestable a altas temperaturas, lo que restringe su aplicación en algunos procesos biotecnológicos [50].

Con el objetivo de conseguir un mayor conocimiento de la fisiología de los microorganismos y desarrollar un método más eficiente para la producción de hidrógeno, se han realizado diversos estudios genéticos de la hidrogenasa [47]. Y mediante estos estudios se ha obtenido información acerca de los principales microorganismos que co-

existen en los cultivos mixtos [57, 58], la tolerancia al oxígeno [50], comportamiento a distintas temperaturas [50, 59] y rendimientos máximos [28].

La hidrogenasa ha sido aislada de distintos géneros de bacterias tales como, *Rhodobacter*, *Rhodospirillum*, *Klebsiella*, *Cellulomonas*, *Vibrio*, *Rhodobium*, *Clostridium*, entre otros [57]. De las especies más estudiadas se encuentran la *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium butyricum*, estas especies son capaces de fermentar una variedad de carbohidratos, incluyendo glucosa, sacarosa, almidón y pectina [57, 58, 60, 61].

1.2.3. Bacterias productoras de hidrógeno predominantes en los cultivos mixtos

Hace más de una década, investigadores han usado microorganismos anaerobios naturales (cultivos mixtos), tomados de lodos de composta [62, 63], suelos profundos, excreta vacuna y porcina [64] para producir hidrógeno a partir de residuos orgánicos disueltos o sólidos. Sin embargo, entender la estructura de los cultivos mixtos ha sido considerado un paso crítico hacia la optimización de la comunidad microbiana y mejora de la producción de hidrógeno [65].

Liu y Fang [33] mediante microscopia electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés) mostraron que el lodo granular utilizado en su estudio estaba compuesto principalmente por bacterias formadoras de esporas como el *Clostridium*. De igual manera, en algunos estudios se ha utilizado diversas técnicas para identificar la contribución específica en la producción de hidrógeno de los microorganismos que co-existen en el sistema [66]. Géneros como *Klebsiella* y *Bacillus* fueron también encontrados como predominantes en los cultivos mixtos, aunque estas bacterias no son productoras de hidrógeno, se observó que su contribución radica en el consumo de oxígeno, ayudando a crear las condiciones anaerobias para la *Clostridium* [39].

Dependiendo de la fuente de los cultivos mixtos, se ha observado que son diferentes los géneros o especies de bacterias las que predominan en ellos, Li *et al.* [67] observaron que las bacterias predominantes en un reactor cuyo inóculo y fuente de

sustrato se obtuvieron de residuos de cocina, pertenecían a la especie *Butyrivibrio fibrisolvens* ocupando el 62% de la población microbiana, mientras que la especie *Clostridium aminophilum* ocupaba el 5%, ambas reportadas como bacterias de rumen. *Butyrivibrio fibrisolvens* posee la habilidad de producir hidrógeno a partir de celulosa, hemicelulosa, pectina y almidón, lo que sugiere que debido a la fuente de sustrato, durante la fermentación con residuos de cocina se estableció satisfactoriamente un consorcio similar al de rumen.

Kim *et al.* [18] en un reactor acidogénico de fermentación butírica, identificaron especies de bacterias pertenecientes al género *Clostridium* tales como; *C. tyrobutyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. acidisoli*, *C. butyricum*, *C. saccharobutylicum*, *C. scatologenes* y *Bacillus racemilacticus*, mediante análisis de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE siglas en inglés) en cultivos mixtos extraídos de digestores anaeróbicos de plantas de tratamiento de agua residual. De los cuales, las primeras cuatro especies fueron relacionadas con la producción de hidrógeno a partir de carbohidratos, mientras que la especie *C. scatologenes* fue relacionada con la producción de acetato mediante el consumo de hidrógeno. Muchos miembros del género *Clostridium* han sido reportados como las especies dominantes en los cultivos mixtos [18, 33, 68, 69] y son conocidos por ser los principales productores de hidrógeno durante la fermentación anaerobia [22, 39].

Los máximos rendimientos de hidrógeno (Y_{H_2}) reportados, están usualmente asociados con la producción de acético y butírico como subproductos, mientras que los bajos rendimientos, están asociados con la producción de propionato y solventes (alcoholes y ácido láctico) [14]. La producción de uno u otro durante la fermentación, es un proceso metabólico regulado que posee distintas rutas [70]. *C. acetobutylicum* es uno de los microorganismos mejor conocidos por su capacidad de producir a nivel industrial importantes solventes químicos como acetona, butanol y etanol [47], similar a algunas cepas de *C. butylicum* [70]. Sin embargo, ciertas cepas de *C. butylicum* producen isopropanol, butanol y etanol como producto final. En un lote de producción normal, especies de *Clostridium* productoras de solventes, producen ácido acético y ácido butírico durante la fase exponencial de crecimiento, posterior a ésta fase, su metabolismo cambia rápidamente para producir solventes [71, 72]. Lo que indica que bacterias de ciertas especies tiene la habilidad de cambiar su producción de ácidos a solventes dependiendo

de las condiciones de crecimiento, tales como *C. pasteurianum* y *C. acetobutylicum* [73], *C. tyrobutyricum*, posee una específica y diferente ruta metabólica que no produce solventes, aunque el enfoque de esta bacteria ha sido principalmente la producción de ácido butírico, también ha mostrado buen desempeño en la producción de hidrógeno [47].

De acuerdo a diversos estudios, se ha observado que existen tres tipos de fermentación, las cuales se pueden identificar mediante la caracterización del efluente, y dependiendo del principal compuesto producido es el tipo de fermentación que se lleva a cabo [74]. Cuando los principales productos de la acidogénesis son ácido butírico, ácido acético, H₂ y CO₂ [62, 75-78] se le conoce como fermentación butírica [79]. Fermentación propiónica cuando el principal producto es ácido propiónico [80, 81] y fermentación etílica cuando los principales productos son etanol, ácido acético H₂ y CO₂ [78].

1.3. Fermentación propiónica

La producción de ácido propiónico está relacionada con el consumo de hidrógeno molecular durante la acidogénesis y la estequiometría lo confirma (Ec. 1) [82, 83].



Algunos investigadores sugieren que la producción de ácido propiónico en la acidogénesis, se debe a la alta presión parcial de hidrógeno en el reactor [14, 84-87]. Boone [85] evaluó las reacciones terminales en un digestor anaerobio mesofílico, usando residuos de carne de ganado como fuente de sustrato y 10 días de tiempo de retención hidráulica (TRH), observó que durante 30 días el reactor se mantenía estable con una producción de ácido propiónico de 0.5 mmol/L, posteriormente al burbujear una mezcla de H₂/CO₂ (70:30) en el interior del reactor la producción de ácido propiónico aumentó a 5.4 mmol/L.

Sin embargo, algunos estudios han concluido que la presión parcial de hidrógeno no influye en la producción de propiónico [20, 88]. Inanc *et al.* [89] observaron que los patrones de producción de Ácidos Grasos Volátiles (AGV) se mantenían similares tanto en vacío (0.13, 0.5 y 0.75 atm) como a alta presión (2 atm mediante el burbujeo de H₂ puro) durante la producción de hidrógeno en un Reactor Continuo de Tanque agitado (RCTA).

Hafez *et al.* [19] mostraron que la acumulación de ácido propiónico aumenta conforme se aumenta la carga orgánica en el sistema, el estudio fue desarrollado a temperaturas de mesofilia en un RCTA con un TRH de 8 Horas y pH 5.5-6, el rendimiento de hidrógeno y la producción de ácido propiónico con una carga orgánica de 6.5 g DQO/L-d (2 g de glucosa/L) fue de 2.8 mol H₂/mol glucosa y 29 mg/L respectivamente, cuando se aumentó la carga orgánica en el sistema a 206 g DQO/L-d (64 g de glucosa/L), la producción de propiónico y el rendimiento de hidrógeno fueron de 988 mg/L y 1.1 mol H₂/mol glucosa respectivamente.

La oxidación de la materia orgánica es usualmente acompañada por deshidrogenación, la cual, a altas concentraciones de sustrato produce una gran cantidad de NADH debido a la ausencia de una cadena transportadora de electrones en la fermentación, este fenómeno frecuentemente coincide con los altos rendimiento de hidrógeno [20, 78, 90, 91] y parte de este NADH incapaz de ser utilizado por la célula se torna en exceso. Sin embargo, se ha observado que durante la fermentación, la producción de ácido acético y ácido propiónico tiene la capacidad de oxidar una molécula más de NADH que cuando la célula produce ácido acético y ácido butírico (Tabla 1.1) [78].

Así, la célula para mantener una apropiada proporción de NADH/NAD⁺ (no se menciona un valor numérico) y reducir la concentración excesiva de NADH, activa la producción de ácido propiónico que además le permite producir ATP [38, 78], se ha observado que para mantener la reacción en equilibrio, la producción de ácido propiónico debe ser de dos moles por cada molécula de ácido acético producida [78].

Tabla 1.1 Oxidación de NADH de la fermentación a partir de la glucosa y producción de H₂ y ATP.

	H ₂ producido (mol)	Rendimiento neto de ATP (mol)	Cantidad de NADH oxidada (mol)
Ácido Propiónico	0	2	1
Ácido Butírico	2	3	0
Etanol	1	1	1

Fuente: Ren *et al.* [78]

1.4. Fermentación etílica

Otra manera como la célula puede mantener la proporción NAD⁺/NADH, es mediante la producción de etanol, puesto que por cada molécula de etanol producida se oxidan a NAD⁺ cuatro moléculas de NADH [78]. De igual modo que con la producción de ácido propiónico, algunos investigadores han relacionado la producción de etanol con bajos rendimientos de hidrógeno, puesto que éste y otros alcoholes contienen átomos de H adicionales que no se encuentran presentes en sus respectivos ácidos [14, 16, 47].

Ren *et al.* [20, 74, 78, 92-94] Sugirieron que la fermentación etílica es la más conveniente para la producción de hidrógeno, puesto que los costos de escalamiento serían reducidos al no requerirse de un sistema de control de pH, y adicional a ello, los rendimientos teóricos son similares a los que se obtiene en la fermentación butírica (Ec. 2 y 3).



Estudios de laboratorio con glucosa como fuente de sustrato, han reportado que el pH óptimo para la fermentación etílica se encuentra en el orden de 4.2 – 4.5 [38, 95]. Ren *et al.* [94] reportaron un rendimiento de 1.96 mol H₂/mol glucosa mediante fermentación etílica y sin control del pH, permitiéndole llegar a valores por debajo de 4.5. Sin embargo, en algunos estudios se ha observado que a pesar de los valores de pH cercanos a 4.5, no sólo no se ha podido establecer la fermentación etílica en el reactor, sino que los rendimientos de hidrógeno reportados han sido bajos [33, 96, 97]. Fang *et al.* [16] evaluaron el efecto del pH en un reactor acidogénico con glucosa como fuente de sustrato y temperatura de mesofilia, observaron que a pH menor a 4.5, los principales productos de la fermentación fueron los ácidos butírico y acético (45.6 y 23.1% respectivamente) mientras que la producción de etanol se mantuvo por debajo de 6.9%. La máxima producción de etanol se observó a pH 6 con 10.1%. Khanal *et al.* [96] reportaron que los principales productos fueron los ácidos acético, butírico y propiónico al evaluar distintos pH (4.5 – 6.5) en un reactor acidogénico con glucosa como fuente de sustrato. Los resultados anteriores coinciden con los obtenidos por Wu y Lin [97] donde concluyen que el pH es un factor importante en la producción de hidrógeno pero los pH menores a 5 no favorecen la producción de hidrógeno. Tal como reporta Hwang *et al.* [98] quienes a pesar de lograr establecer una fermentación etílica a pH 5 en un sistema con glucosa como fuente de sustrato, obtuvieron un rendimiento de hidrógeno máximo de 200 ml H₂/g glucosa (1.6 mol H₂/mol glucosa.) y concentraciones máximas en el biogás de 40% de H₂.

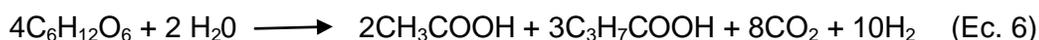
Ren *et al.* [94] explican que la mayoría de los investigadores que intentan producir hidrógeno mediante fermentación etílica utilizan el pretratamiento térmico para enriquecer el cultivo mixto en sus estudios, motivo por el cual han obtenido rendimientos de hidrógeno bajos, ya que este tipo de pretratamiento es ideal para la selección de bacterias productoras de hidrógeno mediante fermentación butírica, tales como las del género *Clostridium*. El pretratamiento adecuado que favorece a la fermentación etílica es el de aireación repetida, puesto que ésta asegura la diversidad microbiana (*Ethanoligenens harbinens* YUAN-3, *Enterobacter aerogenes* Aq16 y *Bacteroides vulgatus* (ATCC8482) productora de hidrógeno y etanol.

1.5. Fermentación butírica

Ha sido la más estudiada en las investigaciones para la producción de hidrógeno por fermentación [20], en ésta, los principales productos en la fase líquida son los ácidos acético y butírico. En principio, el rendimiento teórico de hidrógeno a partir de la fermentación de glucosa puede ser estimado por una ruta metabólica conocida [99], en la cual se produce un rendimiento máximo de 4 moles de hidrógeno por mol de glucosa cuando el ácido acético es el único metabolito producido (Ec. 4) [14], por otro lado, mediante la ruta metabólica del ácido butírico se puede obtener un máximo rendimiento teórico de 2 moléculas de hidrógeno por mol de glucosa cuando el butírico es el único metabolito producido (Ec. 5) [14, 26, 83].



En la práctica, sin embargo, muchos estudios han revelado que el actual rendimiento de hidrógeno es cercano o superior a 2 pero menor a 2.8 moles de hidrógeno por mol de glucosa [19, 100], aún en experimentos con cultivos puros usando glucosa o sacarosa como fuente de sustrato [37, 101, 102]. Esto es debido a que la producción de acético siempre va acompañada de otros compuestos como butírico, propiónico o etanol [78], en la fermentación butírica y cuando se utilizan cultivos mixtos frecuentemente ocurre una combinación en la producción de ácidos como lo plantea la siguiente reacción (Ec. 6), donde, el rendimiento máximo teórico es de 2.5 moles de hidrógeno por mol de glucosa [10].



Se ha observado que muchos factores incluyendo termodinámicos [103, 104], la regulación metabólica [99, 105, 106], la regulación cinética [30, 107], la estructura de la comunidad microbiana [108, 109], o la combinación de ellos puede alterar la distribución de los electrones equivalentes dentro de otros productos además de hidrógeno y acético. Por esa razón la predicción de la producción de hidrógeno puede ser muy difícil, especialmente en casos donde se involucran cultivos mixtos y sustratos complejos [110]. Esta impredecibilidad y usual inestabilidad en los procesos biológicos de producción de hidrógeno, son el reflejo de las diferentes condiciones de la fermentación, las cuales son influenciadas por la concentración de sustrato [111, 112], pH [16, 113-115], TRH [109, 112, 116-119], y la comunidad bacteriana productora de hidrógeno [109].

1.5.1. Efecto de la concentración del sustrato en la fermentación butírica.

La concentración de sustrato es un parámetro importante en los estudios de generación de hidrógeno mediante fermentación butírica. Con el objetivo de optimizar el sistema de producción, es esencial definir el rango de concentraciones que el sistema puede operar efectivamente, así como el rango de concentración adecuado para obtener el máximo rendimiento de hidrógeno [19]. En la literatura se ha reportado que, a concentraciones altas de sustrato pueden existir problemas de inhibición producida por la sobrealimentación del sistema [14].

Kyazze *et al.* [120] observaron que el rendimiento de hidrógeno redujo de 1.7 mol H₂/mol hexosa con una concentración de sustrato de 10 g/L de sacarosa a 0.8 mol H₂/mol hexosa cuando aumentaron la concentración a 50 g/L de sacarosa. Hafez *et al.* [121] observaron que el rendimiento de hidrógeno de 2.8 mol H₂/mol glucosa obtenido a 32 g glucosa/L disminuyó a 1.2 mol H₂/mol glucosa al aumentar la concentración de sustrato a 48 g glucosa/L y continuó disminuyendo hasta 1.1 mol H₂/mol glucosa con 64 g glucosa/L. Kim *et al.* [18] evaluaron el efecto de variar la concentración de sustrato de 10 a 60 g DQO/L en un RCTA, en donde las condiciones de pH, TRH y temperatura fueron mantenidas constantes a 5.4, 12 h y 35 ± 1° C, con el objetivo de activar la ruta metabólica de la fermentación butírica en las bacterias. Los resultados mostraron que los

productos solubles de la fermentación fueron butírico, acético, láctico, etanol, y cantidades trazas de fórmico, proiónico, isobutírico, isovalérico, propanol, isopropanol, butanol y sec-butanol. En todas las corridas el butírico fue el principal producto, sin embargo, se observó que al reducir la concentración de sustrato en el influente de 30 a 10 g DQO/L, la composición del butírico en el efluente también redujo de 47.1 a 28.9%, al mismo tiempo que el rendimiento de hidrógeno disminuyó de 1.09 a 0.38 mol H₂/ mol de glucosa. Posteriormente la concentración de sustrato fue aumentada paso a paso de 10 a 15, 20 y 30 g DQO/L, el rendimiento de hidrógeno y la composición de butírico incrementaron, obteniendo los mismos valores que se obtuvieron cuando se redujo la concentración de sustrato. Subsecuentemente, la concentración de sustrato fue incrementada de manera paulatina hasta llegar a 60 g DQO/L, provocando a partir de 35 g DQO/L la caída en el rendimiento de hidrógeno junto con la eficiencia de degradación de sacarosa, a partir de esa concentración de sustrato se empezaron a registrar altos remanentes de sacarosa en el efluente (>8.8 g DQO/L) lo que indicó la inhibición por sustrato de la actividad microbiana.

Van Ginkel y Logan [122] en un RCTA a 10 h de TRH, pH 5.5 y 30° C, obtuvieron como productos principales hidrógeno, ácido butírico y ácido acético, lo que indicó que el tipo de fermentación obtenida en el reactor fue acidogénica, específicamente butírica. Sin embargo, observaron que al aumentar la concentración de sustrato de 2.5 a 10 g DQO/L, la proporción molar acético/butírico (HAc/HBu) disminuyó de 1.08 a 0.62, manteniéndose durante todas las corridas una producción mayor de butírico que de acético. Esta disminución fue acompañada con la reducción del rendimiento molar de hidrógeno en el sistema, pasando de 2.8 a 2.2 mol H₂/mol glucosa. Al mismo tiempo que se observó un ligero incremento en la producción de acetona, etanol, propanol, butanol y ácido propiónico en concentraciones de sustrato de 7.5 y 10 g DQO/L, lo que indicó que el metabolismo microbiano de la fermentación butírica empezó a ser reemplazada por el metabolismo de la solvetogénesis debido al aumento en la concentración de sustrato.

Hasta la fecha, diversos estudios de fermentación se han desarrollado satisfactoriamente operando el sistema en alimentación continua de sustrato con concentraciones de 10 – 20 g DQO/L [37, 123, 124], algunos otros han operado el sistema con concentraciones de sustrato arriba de 40 g DQO/L [18, 19, 122], y la mayoría coincide

en que la concentración de sustrato influye en la distribución de los productos metabólicos durante la fermentación.

1.5.2. Influencia del pH

El pH es un parámetro clave en los procesos de producción de hidrógeno, debido a que este puede afectar directamente la actividad de la hidrogenasa [73], así como la ruta metabólica elegida por la célula [62]. Además de que es un factor importante para suprimir la actividad de los microorganismos metanogénicos consumidores de hidrógeno [26, 125].

Valores de pH menores a 5, podrían conducir a la inhibición del metabolismo acidogénico, activando la ruta metabólica para la solvetogénesis [126], provocando la producción de solventes tales como acetona y etanol. Se ha observado que la producción de hidrógeno disminuye por generación de solventes especialmente a pH menores de 4.5 [20, 127]. Los estudios que se han desarrollado sin controlar el pH durante la fermentación, han resultado en la caída del mismo y junto con ello, las tasas de producción de hidrógeno, obteniéndose menores rendimientos que cuando se controla [96].

Diversas investigaciones han reportado distintos valores de pH como los adecuados para obtener los mejores rendimientos de hidrogeno mediante fermentación butírica [16, 37, 96, 114, 128]. En estudios realizados con Agua Residual Sintética (ARS) donde se utilizó glucosa como única fuente de sustrato, se observó que el valor de pH que provee las mejores condiciones ambientales para la producción de hidrógeno se encuentra entre 5.5 y 6.2 [26], Oh *et al.* [129] y Lin y Chang [124] reportan que estas se dan con pH de 6.2, Horiuchi *et al.* [130] a pH de 6 [130] y Lin y Chang [131] a pH de 5.7.

Oh *et al.* [101] a temperaturas de termofilia (60°C) reportaron un rendimiento máximo de 1.1 mol H₂/mol glucosa a pH de 5.5, mientras que Fang *et al.* [37] reportaron que a pH de 5.5 obtuvieron el mejor rendimiento de hidrógeno (2.1 mol H₂/mol glucosa) a temperaturas de mesofilia y en reactores RCTA [16]. Aceves *et al.* (2007) al evaluar distintos pH reportaron que el máximo rendimiento de hidrógeno (2.5 mol H₂/mol

sacarosa) lo obtuvieron a pH de 5.5 mientras que los principales productos de la fermentación fueron acético y butírico.

En la Tabla 1.2 se muestran diferentes estudios en los cuales también se observó que controlando el pH y manteniéndolo cercano a 5.5, se obtuvieron los mejores rendimientos de hidrógeno. Estos estudios fueron realizados con ARS cuya única fuente de sustrato fue glucosa, desarrollados a temperaturas de mesofilia en reactores RCTA.

Tabla 1.2 Rendimiento de hidrógeno a diferentes condiciones de operación en reactores RCTA.

RPM	TRH	pH	Temp.	DQO	YH ₂	Referencia
500	----	6	30	5	1.08	Zheng <i>et al.</i> [132]
200	12	5.4	35	30	1.3	Kim <i>et al.</i> [18]
280	8	5.5	37	10	1.93	Zhang <i>et al.</i> [119]
----	2	5.5	55	34	1.74	Yu <i>et al.</i> [133]

RPM: Revoluciones por minuto, TRH: Tiempo de Retención Hidráulica (h), DQO: Demanda Química de Oxígeno (g/L), YH₂: Rendimiento de Hidrógeno (mol H₂/mol glucosa).

1.5.3. Mecanismos para prevenir la producción de metano

Cuando la metanogénesis es suprimida de la digestión anaerobia, el hidrógeno puede ser cosechado con cultivos mixtos mediante fermentación a partir de residuos orgánicos [134], sin embargo, obtener de manera fácil y económica un consorcio microbiano con una gran cantidad de bacterias anaerobias productoras de hidrógeno, ha sido una de las principales dificultades del proceso [14, 135, 136]. Hasta la fecha, un gran número de pretratamientos han mostrado su efecto sobre la producción de hidrógeno, lo cual basado en estudios anteriores, tal efecto es principalmente causado por la alteración en la composición de las comunidades microbianas inducida por los diferentes pretratamientos [137]. Los cuales han sido ampliamente usados para eliminar las

bacterias metanogénicas no formadoras de esporas, y beneficiando a las bacterias productoras de hidrógeno formadoras de esporas (como *Clostridium*), las cuales protegen a los microorganismos cuando se encuentran bajo condiciones ambientales extremas [136]. Se ha reportado el uso de diversos pretratamientos, tales como: el térmico, el alcalino, el ácido, la aireación, la sonicación, la luz ultravioleta, las microondas, el ultrasónico, el cloroformo, el ácido 2-bromoetanosulfónico, el iodopropano, o la combinación de microondas-ácido, las microondas-alcalino, el térmico-ácido y el térmico-alcalino [134, 136-146].

Sin embargo algunos han mostrado no ser fáciles de implementar o ser relativamente costosos, tal como los pretratamientos químicos con el ácido 2-bromoetanosulfónico, iodopropano y cloroformo [147]. Se han reportado pérdidas sustanciales de hidrógeno debido a que algunas bacterias homoacetogénicas pueden sobrevivir al pretratamiento térmico y éstas consumen el hidrógeno que se genera en la fermentación para producir acético [148]; sin embargo, el pretratamiento térmico ha sido el proceso más utilizado para seleccionar bacterias productoras de hidrógeno [26] y se le ha relacionado con altos rendimientos de hidrógeno [134].

Dong *et al.* [141] en una revisión de literatura encontraron que dependiendo del origen del inóculo, éste requiere de un pretratamiento específico, y que el mejor para uno, no necesariamente será el mejor para otro (Tabla 1.3). Así mismo se observa que el pretratamiento térmico es el mejor para lodos activados de digestores anaerobios.

Tabla 1.3 *Pretratamientos realizados a inóculos de procedencia anaerobia para la inhibición de la generación de metano y rendimiento de hidrógeno.*

Fuente de inóculo	Pretratamiento	Sustrato	Rendimiento (mol H ₂ /mol glucosa)	Referencia
Lodo estabilizado de un UASB	Térmico	Sacarosa	2	Mu y Wang [134]
Lodo del digestor anaerobio de una planta de tratamiento de aguas residuales	Aireación repetida	Glucosa	1.9	Ren <i>et al.</i> [94]
Lodo activado de un digestor anaerobio de laboratorio	Microondas – Ácido	Residuos de maíz	1.53	Liu y Cheng [149]
Lodo del digestor anaerobio de una planta de tratamiento de aguas residuales	Ácido	Glucosa	1.51	Chang <i>et al.</i> [143]
Lodo del digestor anaerobio de una planta de tratamiento de aguas residuales	Cloroformo	Glucosa	1.08	Hu y Chen [142]
Lodo del digestor anaerobio de una planta de tratamiento de aguas residuales	Alcalino	Pulpa de remolacha	0.92	Ozkan <i>et al.</i> [139]
Lodo del digestor anaerobio de una planta de tratamiento de aguas residuales	Alcalino	Residuos de comida	0.87	Kim y Shin (2008)
Lodo marino	Ácido	Glucosa	0.86	Liu <i>et al.</i> (2009)
Lodo del digestor anaerobio de una planta de tratamiento de aguas residuales	Congelación y descongelación	Glucosa	0.027*	Ting <i>et al.</i> (2004)
Lodo de un tanque aireado de aguas residuales	Alcalino	Glucosa	0.09*	Cai <i>et al.</i> [138]
Lodo del digestor anaerobio de una planta de tratamiento de aguas residuales	Térmico	Arroz + lechuga molida	0.69*	Dong <i>et al.</i> [141]

* Dato calculado a partir de la información de la referencia

1.5.4. Efecto del TRH sobre la producción de hidrógeno y la comunidad microbiana

El TRH es el volumen del reactor entre el caudal de alimentación (incluye donador de electrones). Este ha sido un parámetro ampliamente estudiado con el objetivo de determinar su efecto sobre el desempeño de la producción de hidrógeno en los sistemas de alimentación en continuo [30, 107, 109, 118, 122]. Se ha observado que puede ser utilizado satisfactoriamente como estrategia de control para minimizar el crecimiento de las bacterias consumidoras de hidrógeno [76, 150]. Basado en esto, TRH cortos pueden ser usados para eliminar por completo las bacterias metanogénicas, ya que estas poseen una tasa de crecimiento específico (μ_{\max}) de 0.0167 h^{-1} , mientras que la tasa de crecimiento de las productoras de hidrógeno es de 0.083 h^{-1} [127].

Zhang *et al.* [119] observaron que acortar el TRH de 12 a 6 h redujo la diversidad de la población bacteriana asociada con la producción de ácido propiónico, sin afectar la existencia de las especies dominantes productoras de hidrógeno. De modo similar, Chen y Lin [151] observaron que se llevó a cabo una selección de la población microbiana mediante la reducción del TRH de 2 a 0.5 días, obteniendo como resultado un incremento en el rendimiento de hidrógeno de 0.57 a 1.7 mol H_2 /mol glucosa. Chen *et al.* [152] calcularon que la máxima tasa de crecimiento específica (μ_{\max}) para un cultivo mixto aclimatado para producir hidrógeno, fue de 0.172 h^{-1} , lo que a su vez significa que 0.172 h^{-1} (6 h de TRH) es el valor crítico de tasa de dilución (D , donde $D=1/\text{TRH}$) para la estabilidad de un reactor operado en continuo, ya que cuando $D > \mu_{\max}$ ocurre que la biomasa puede ser lavada del sistema, por lo tanto, TRH < 6 h no son recomendados en reactores para producción de hidrógeno.

De manera gráfica, Valdez y Poggi [127] muestran la tendencia de la producción de hidrógeno en un amplio intervalo de TRH (Figura 1.3). La figura fue realizada con los datos de cuatro diferentes estudios [30, 63, 153, 154], y se puede observar que a pesar de las diferencias entre los trabajos (tales como sustrato, tipo de inóculo, temperatura de incubación) la tendencia es fuertemente conservada: a altos TRH, la tasa de producción de hidrógeno disminuye, mientras que a menor TRH aumenta, con un valor crítico de 6 h. Estos estudios demostraron que mediante la reducción del TRH es posible lavar bacterias

metanogénicas del sistema, aunque este método puede ser solamente aplicado en reactores con sustratos solubles simples [127].

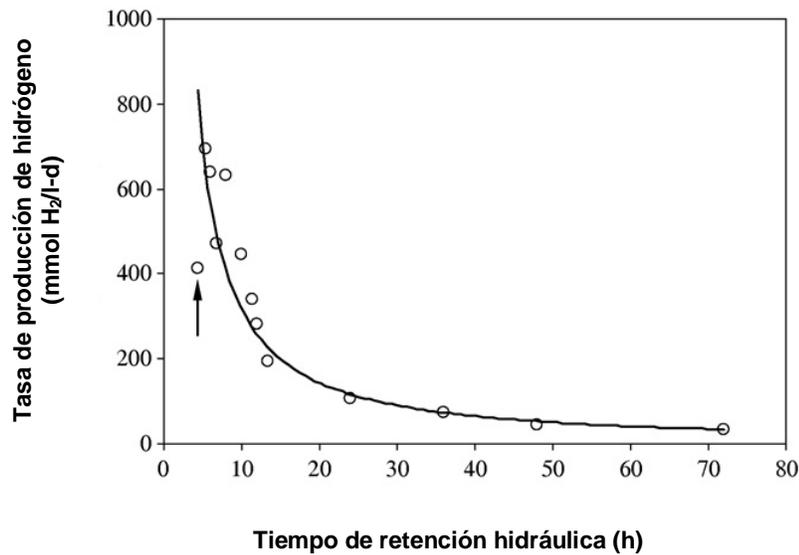


Figura 1.3 Análisis del efecto de diferentes TRH sobre la tasa de producción de hidrógeno. La flecha en la figura indica el valor crítico observado a 6 h de TRH [127].

El TRH además de estar asociado con el crecimiento de la población bacteriana, también está asociado al metabolismo bacteriano, sin embargo se ha observado que a determinados valores, el TRH no influye en la producción de metabolitos solubles. Badié *et al.* [155] observaron que TRH altos (> 36 h), los metabolitos producidos en la fermentación, no se ven afectados por la variación del TRH, sin embargo, a estos TRH los productos principales son ácido butírico y ácido acético, indicando que la producción de hidrógeno se lleva a cabo mediante acidogénesis. Resultados similares reportaron Karlsson *et al.* [156] quienes operaron un RCTA a distintas temperaturas (20, 37 y 55° C), distintos TRH (2, 5 y 8 días) y distintas tasas de flujo de N₂ (5, 25 o 125 mL/min), con el objetivo de evaluar la relación entre la cantidad de hidrógeno producido y las tres variables de entrada ya mencionadas. Un software Modde 6 basado en un modelo cuadrático polinomial, fue usado para identificar la relativa influencia de cada una de las variables de entrada, también los datos de las concentraciones de los metabolitos

producidos fueron evaluados en este modelo. El análisis de regresión, mostró que a una temperatura de 55° C, una tasa de flujo de N₂ de 125 mL/min y un TRH de 2 días, fueron las variables de entrada más recomendables dentro del intervalo evaluado para la producción de hidrógeno. No obstante, la temperatura mostró ser el parámetro más importante en relación al rendimiento de hidrógeno y al cambio en los patrones de producción de los AGV, mientras que el TRH fue la variable de entrada con menos influencia en la producción de AGV, concluyendo de acuerdo al modelo, que TRH altos no influyen en el metabolismo bacteriano.

Por el contrario, la producción de metabolitos solubles en reactores operados a TRH bajos (< 36 h) ha mostrado ser influenciada por la variación de este parámetro. Fan *et al.* [118] observaron que la distribución individual de los AGV producidos durante la fermentación, guardan una relación con la variación del TRH. Sus resultados mostraron que la producción de ácido butírico y ácido acético aumentó significativamente al incrementar el TRH de 8 a 18 h (de 160 a 1670 m/L y de 640 a 1220 mg/L, respectivamente). Buitrón *et al.* [157] al evaluar el efecto de aumentar el TRH de 12 a 24 h en un reactor AnSBR (Anaerobic Sequencing Batch Reactor) operado con vinaza de tequila a 3 g DQO/L, obtuvieron que a 24 h de TRH se produjo la mayor concentración de AGV con un total (incluyendo ácido butírico, ácido acético y ácido propiónico) de 1396 mg/L, mientras que a 12 h obtuvieron un total de 77 mg/L.

1.6. Hipótesis

Mediante la variación del TRH es posible obtener un rendimiento de hidrógeno competitivo a altas concentraciones de sustrato fácilmente biodegradables en un RCTA con el uso de un cultivo mixto natural y de la región.

CAPITULO 2

METODOLOGÍA

2. METODOLOGÍA

2.1. Ensamblado del Reactor y condiciones de operación.

El reactor utilizado consistió de un RCTA, fabricado en vidrio de 7 L de volumen total y 5 L de volumen de operación, provisto de un sistema de agitación de flujo radial impulsado por tres aspas tipo Rushton de seis hojas. Para el control del pH, TRH, temperatura y velocidad de agitación, se instalaron instrumentos de medición y control independientes. Posterior al ensamble del reactor se realizaron pruebas de estanqueidad y fugas en la corriente gaseosa (Figura 2.1).

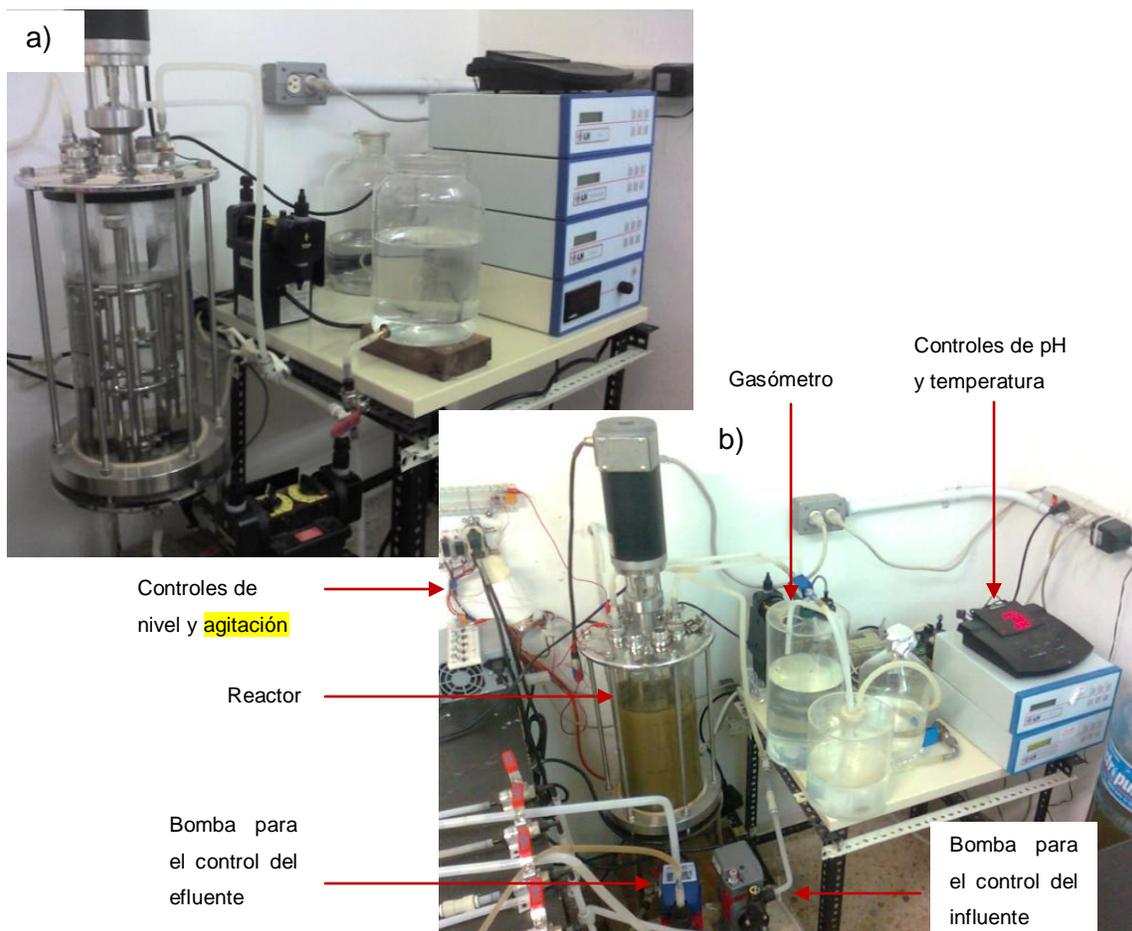


Figura 2.1 a) Pruebas de estanqueidad b) RCTA ensamblado con periféricos de control in situ.

La temperatura se mantuvo a 37 ± 0.5 °C mediante un sistema de control automático formado por una resistencia y un termopar alojados en el interior del reactor. La velocidad de agitación en el reactor fue de 190 rpm y fue establecida mediante la alimentación de 12 volts de corriente directa al motor de agitación con el uso de una fuente de poder regulada. El pH se mantuvo a 5.5 ± 0.1 en todos los experimentos, para lo cual el personal del departamento de instrumentación del CICY, desarrolló una tarjeta de control que asistido por un potenciómetro marca pH-Termo Orion modelo 350 dosificaba una solución de bicarbonato de sodio 1M mediante una bomba peristáltica.

El biogás producido fue medido por desplazamiento en un gasómetro de solución salina acidificada según [158]. El gasómetro utilizado fue construido en un proyecto cuyo objetivo fue automatizar medición del biogás producido por biorreactores [159]. El sistema automático de medición de volumen consistió de un contenedor de acrílico diseñado herméticamente para almacenar 4 litros de agua, de tal forma que en sus dos cilindros el nivel de agua sea el mismo mediante un tubo adaptado en la parte inferior de ambos cilindros comunicándolos entre ellos. Con este diseño, el biogás producido desplaza una columna de agua del cilindro pequeño hacia el cilindro más grande (Figura 2.2). En el cilindro pequeño queda contenido el gas producido, el cual, mediante un cálculo sencillo, con el volumen del contenedor conocido y el número de ciclos de desfogue realizados, se pueda estimar la cantidad producida de gas metano por día.

La automatización del sistema consiste en que cada vez que el sensor detecte que la columna de agua ha sido desplazada (sube el nivel) mandará un señal de entrada al PL 707 para que este dé una señal de salida hacia una electroválvula 2/2 N.C. y se produzca el desfogue del gas hacia el ambiente para que la columna de agua que subió en el proceso anterior se nivele nuevamente y mediante un contador llevar un registro de las veces que el gas desplaza al agua (Figura 2.3).

La muestras de la corriente gaseosa fueron tomadas de un puerto de muestreo ubicado en la parte superior del reactor, y fueron caracterizadas mediante cromatografía de gases, para lo cual se empleó un cromatógrafo marca Perkin Elmer modelo Clarus 500, equipado con un detector de conductividad térmica (TCD), bajo las siguientes condiciones de operación; un programa isotérmico a 30°C durante 10 minutos; gas

acarreador nitrógeno; flujo de gas 20 ml/min; temperatura de inyección 70°C; temperatura del detector 200°C; columna Molsieve.

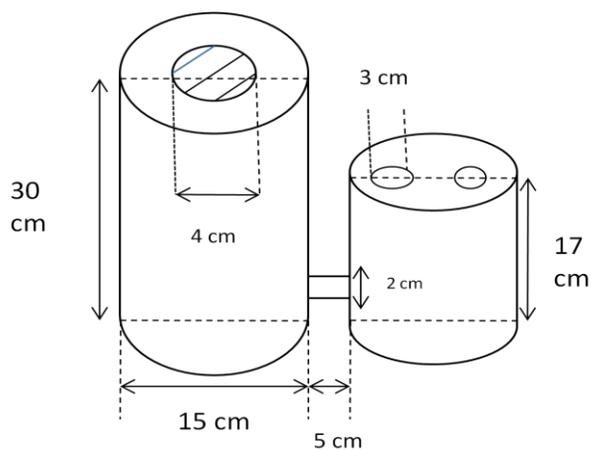


Figura 2.2 Esquema del contenedor de acrílico, tomado de [159]

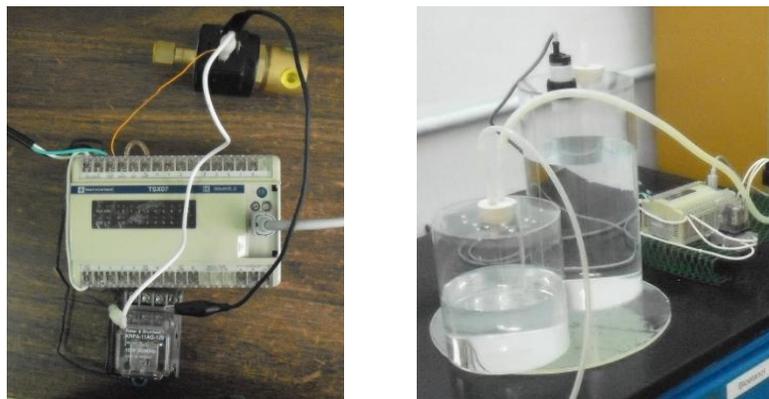


Figura 2.3 a) Esquema del PLC 707 utilizado para la automatización del gasómetro b) Sistema completo de medición de biogás [159]

Para la fase líquida, la composición de AGV en el fermentador, fue caracterizada por cromatografía de gases con un detector de ionización de flama (FID), las condiciones de operación fueron, un programa isotérmico a 160°C durante 20 minutos; temperatura del inyector 240°C; temperatura del detector, 250°C; split 20:1; velocidad lineal de 24 cm/s; gas acarreador nitrógeno, el horno fue operado en una rampa de 50, 100 y 200°C; columna ECTM – WAX .

La DQO se determinó mediante el método estandarizado 8000 de la USEPA, utilizando un colorímetro Hach DR-890.

2.2. Control del nivel de volumen de operación del reactor

Para mantener el nivel de volumen de operación del reactor y el tiempo de retención hidráulica del sistema, se diseñó y construyó un sensor de nivel con una precisión de \pm 200 ml para garantizar que el volumen del efluente fuera igual al afluente.

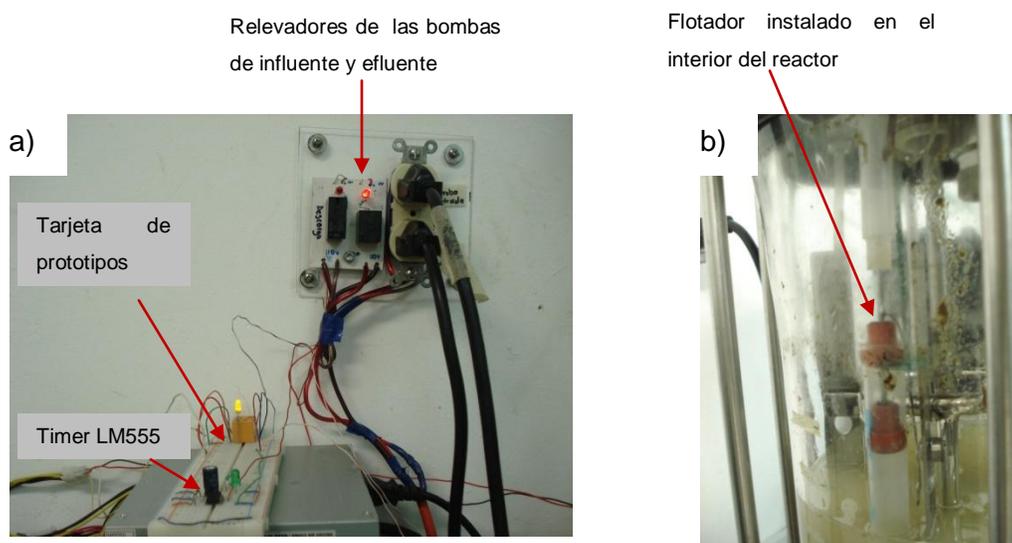


Figura 2.4 a) Esquema del circuito electrónico del control de bombas b) Esquema del medidor de nivel ya instalado en el interior del reactor.

El sensor de nivel compuesto de dos partes (control de bombas y medidor de nivel) tenía la única función de controlar el apagado y encendido de las bombas peristálticas de alimentación y descarga según se requería para mantener el nivel. El circuito electrónico del control de bombas fue ensamblado en una tarjeta de prototipos (Protoboard), en la cual un timer LM555 controló dos relevadores que funcionaron como interruptores para el apagado y encendido de las bombas, el timer LM555 era activado por una señal de máximo 200 mA enviada por el medidor de nivel. El medidor de nivel se ubicó en el interior del reactor, que consistió de un flotador que cerraba y abría un circuito de 5 V y 200 mA (Figura 2.4).

2.3. Agua residual sintética.

El reactor fue alimentado con agua residual sintética enriquecida, teniendo como base la formulación de Alzate *et al.* [64], la solución de elementos traza se formuló en base a Aceves *et al.* [160] (Tabla 2.1). Se evaluaron dos concentraciones de sustrato, 10 y 80 g glucosa/L.

Tabla 2.1 Composición del agua residual sintética utilizada para la alimentación del reactor durante el desarrollo de los experimentos.

Compuestos	Concentración (g/L)
Acido acético glacial	0.5
NaHCO ₃ Comercial	1
K ₂ HPO ₄	0.2
NH ₄ Cl	0.1
ZnCl ₂	10
CaCl ₂ anhidro	10
FeSO ₄ . 7H ₂ O	25
CoCl ₂ . 6H ₂ O	5
CuSO ₄ . 5H ₂ O	5
NiCl ₂ . 6H ₂ O	20
MnCl ₂ . 4H ₂ O	20

2.4. Inóculo

El reactor fue inoculado con 500 ml de un cultivo mixto preparado según Alzate *et al.* [64] el cual consistió de 30 g/L de suelo profundo, 300 g/L de excreta de vacuno, 150 g/L de excreta de cerdo, 1.5 g/L de carbonato de sodio y un litro de agua. El inóculo fue sujeto a un pretratamiento térmico (100°C, 15 min) con la finalidad de inhibir las bacterias consumidoras de hidrógeno y enriquecer el cultivo con las bacterias formadoras de esporas tal como el *Clostridium* spp. El reactor fue mantenido en cultivo batch durante 12 h con el objetivo de permitir la activación de las bacterias esporuladas, posteriormente se inició la alimentación en continuo del reactor.

2.5. Diseño de los experimentos

Los parámetros importantes de diseño en este tipo de sistemas, son los TRH y las concentraciones de sustrato. A mayores cargas orgánicas y menores tiempos de retención hidráulica los sistemas tienden a colapsar debido a la acumulación de ácidos carboxílicos en el sistema, por ello, en este estudio se pretende evaluar el comportamiento de concentraciones donde el sistema no presenta problemas versus aquellas donde valores superiores a 30 g DQO/L [18, 111, 122, 161, 162] lo convierten en un medio tóxico aunado a cambios en los tiempos de retención hidráulico.

El RCTA fue operado durante toda la experimentación a $37 \pm 0.5^\circ \text{C}$, pH de 5.5 ± 0.1 y 190 rpm. Después de inocular el reactor con la concentración de sustrato a evaluar, se mantuvo el cultivo batch durante 12 h para permitir la activación de las bacterias formadoras de esporas, y se evaluó en continuo dos diferentes concentraciones de sustrato a 10 y 80 g DQO/L inicialmente con 9 h de TRH.

En la segunda fase de experimentación se realizaron modificaciones del TRH (6 y 12 h) como posible factor limitante en la eficiencia de la producción de hidrógeno a altas concentraciones de sustrato simple (80 g DQO/L). Finalmente las corrientes de interés fueron la gaseosa y la líquida, es decir, porcentaje de hidrógeno y concentración de ácidos carboxílicos, que se ven reflejados en los rendimientos del sistema.

2.5.1. Parámetros evaluados

Para determinar el porcentaje de hidrógeno contenido en el biogás se realizó una curva de calibración mediante cromatografía de gases para identificar el tiempo de retención en el cromatograma y el área bajo la curva (Figura 2.5b). Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron ya explicadas anteriormente. En la fase líquida: Los ácidos carboxílicos a cuantificar fueron, el acético, butírico, propiónico y etanol clasificado como un solvente. Para determinar el tiempo de retención de cada compuesto, se realizaron curvas de calibración de manera individual con muestras de grado reactivo (Figura 2.5a).

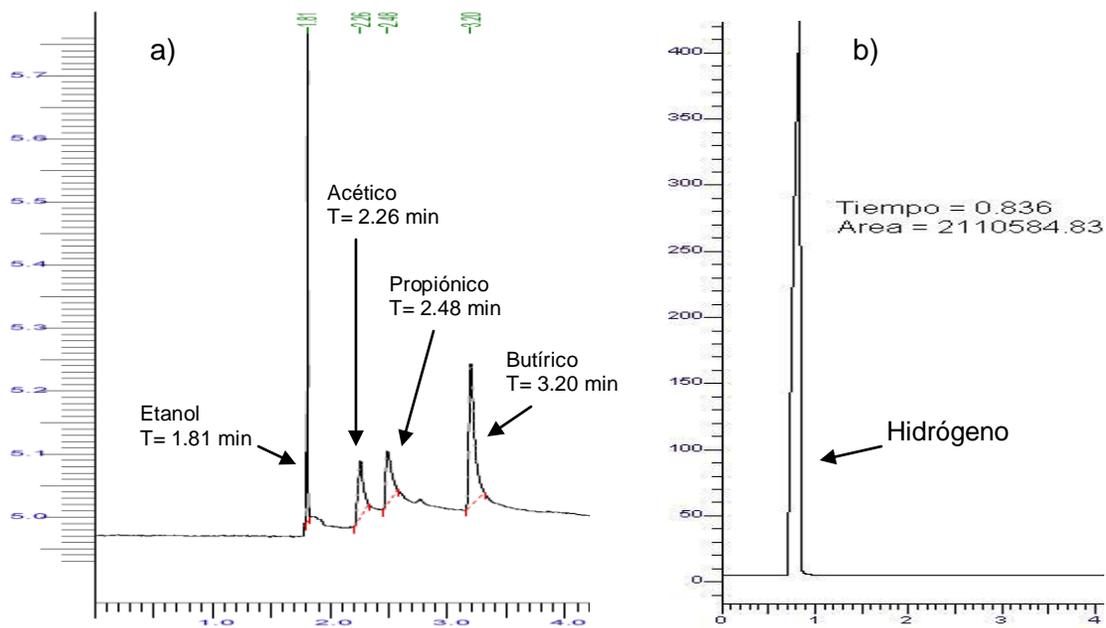


Figura 2.5 a) *Tiempos de retención de los AGV y etanol* b) *Tiempo de retención del hidrógeno.*

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Desempeño del RCTA a diferentes concentraciones de sustrato

Distintas estrategias operacionales han sido estudiadas con el objetivo de aumentar la rentabilidad de los sistemas en continuo para la producción de hidrógeno, entre ellas encontramos el efecto de la concentración de sustrato. Los mejores rendimientos de hidrógeno para los sistemas en continuo se han obtenido a concentraciones menores de 30 g DQO/L [30, 119, 124, 130], mientras que a concentraciones mayores se han reportado caídas en los rendimientos de hidrógeno [18, 19].

En este estudio, cuando el reactor fue operado a 10 g DQO/L y 9 h de TRH, el rendimiento de hidrógeno obtenido fue de 2.7 mol H₂/mol glucosa (314.5 ml H₂/g glucosa), 54.9% de H₂ contenido en el biogás y 97.9% de conversión de glucosa (Tabla 1). Estos resultados son consistentes con Hafez *et al.* [121] quienes obtuvieron 2.8 mol H₂/mol de glucosa en un RCTA operado a 8 g DQO/L y con un TRH de 8 h, la concentración de H₂ en el biogás fue de 73% y 99.9% de conversión de glucosa. En ambos estudios los productos predominantes en la fase líquida fueron ácido butírico y ácido acético, en el presente estudio, la producción fue de 3103.9 mg/L y 2423.3 mg/L respectivamente, mientras que en el estudio de Hafez *et al.* [121] la producción de butírico y acético fue de 1594 mg/L y 2494 mg/L respectivamente. En ambos estudios, la producción de ácido propiónico y de etanol se mantuvo en concentraciones casi nulas (trazas). Van Ginkel y Logan [122], Shen *et al.* [163] y Li *et al.* [164], bajo condiciones similares de operación a las planteadas en este estudio, obtuvieron rendimientos de hidrógeno menores, 2.2, 1.7 y 1.56 mol H₂/mol de glucosa respectivamente.

La producción casi nula de ácido propiónico y etanol, junto con el alto porcentaje de glucosa convertida, indican que las condiciones ambientales (pH, concentración de sustrato, velocidad de agitación, TRH y temperatura) permitieron la activación satisfactoria del metabolismo bacteriano para la fermentación butírica, lo cual se vio reflejado en el rendimiento de hidrógeno.

Con el objetivo de determinar la concentración adecuada de sustrato que maximice la producción de hidrógeno, el reactor fue reiniciado y operado a 80 g DQO/L y TRH de 9 h. Notablemente con el aumento de la concentración de sustrato, el rendimiento de hidrógeno, el contenido de H₂ en el biogás y la glucosa convertida, redujeron. Bajo estas condiciones, el rendimiento de hidrógeno obteniendo fue de 2.0 mol H₂/mol glucosa (238.0 ml H₂/g glucosa), el contenido de H₂ en el biogás y la eficiencia de degradación de glucosa fueron, 47.2% y 85.3% respectivamente, mientras que los productos finales predominantes en la fase líquida fueron el ácido propiónico (11915.3 mg/L) y etanol (11959.6 mg/L) (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Resultados obtenidos en el experimento a diferentes concentraciones de sustrato.

Parámetros	Sustrato en el influente (g DQO/L)	
	10	80
H ₂ producido (L/lote)	3.5	19.0
H ₂ en biogás (%)	54.9	47.2
Y _{H₂} (mol H ₂ /mol glucosa)	2.7	2.0
Glucosa Convertida (%)	97.9	85.3
*Eficiencia de conversión (%)	67.5	50
Acético (mg/L)	2423.3	8630.5
Butírico (mg/L)	3103.9	1232.4
Propiónico (mg/L)	Trazas	11915.3
Etanol (mg/L)	Trazas	11959.6
**MS totales (mg/L)	5527.27	33737.93

*Asumiendo un máximo de conversión de 4 mol H₂/mol glucosa.

**Metabolitos solubles totales (AGV y etanol)

El análisis de la fase gaseosa mostró que H₂ y CO₂ fueron los únicos componentes del biogás, no se detectó producción de gas metano, lo que indica que las bacterias metanogénicas fueron satisfactoriamente eliminadas con el pretratamiento térmico. Las concentraciones de hidrógeno en el biogás obtenidas en ambas corridas, se encuentran dentro de los valores reportados en estudios anteriores donde se ha usado glucosa o sacarosa como sustrato [18, 122, 124]. Así mismo, la reducción del contenido de

hidrógeno en el biogás al incrementar la concentración de sustrato, ha sido reportada en estudios anteriores, incluso a concentraciones menores a 30 gDQO/L. Zhang *et al.* [165] observaron que el contenido de H₂ en el biogás disminuyó de 62.8 a 53.6% cuando incrementaron la concentración de sustrato de 5 a 15 g DQO/L. Hafez *et al.* [121] en un intervalo mayor de concentraciones de sustrato, observaron el mismo comportamiento, la concentración de hidrógeno en el biogás disminuyó de 71 a 39% al incrementar la concentración de sustrato de 8 a 64 g DQO/L.

Está claro que el aumento de la concentración de sustrato reduce la concentración de hidrógeno en el biogás, no obstante, se ha reportado que el rendimiento de hidrógeno puede aumentar con el incremento de la concentración de sustrato en valores por debajo de 30 g DQO/L [121]. Zhang *et al.* [165] observaron que la concentración de H₂ en el biogás se redujo de 62.8 a 53.6% cuando incrementaron la concentración de sustrato de 5 a 15 g DQO/L, mientras que el rendimiento de hidrógeno aumentó de 0.8 a 1.2 mol H₂/mol glucosa. Wu *et al.* [166] obtuvieron un incremento en el rendimiento de hidrógeno hasta alcanzar un máximo de 1.6 mol H₂/mol glucosa cuando aumentaron la carga orgánica del sistema de 40 a 120 g DQO/L-d. Kim *et al.* (2006) sugirieron que un efecto campana se produce al incrementar la concentración de sustrato en el sistema, al evaluar la variación de la concentración de sustrato dentro del rango de 10 a 60 g DQO/L, observaron que el máximo rendimiento de 1.09 mol H₂/mol glucosa lo obtuvieron a 30 g DQO/L, y a partir de 35 g DQO/L observaron una caída en el rendimiento de hidrógeno debido a una sobre alimentación del sistema.

En este trabajo de investigación se observó una reducción en el rendimiento de hidrógeno al aumentar la concentración de 10 a 80 g DQO/L, lo cual sugiere que 80 g DQO/L ya representan condiciones de sobrealimentación para el sistema. Van Ginkel y Logan (2005) concluyeron que el rendimiento de hidrógeno tiende a disminuir conforme se aumenta la concentración de sustrato, mientras que, Rodríguez *et al.* [167] y Wang y Wan [168] observaron que la sobrealimentación del sistema ocurre en ambientes de concentración de glucosa superiores a 20 g DQO/L [167, 169]. Hafez *et al.* [121] reportaron que la reducción del rendimiento de hidrógeno en un RCTA fue consecuencia de la inhibición por sustrato o sobrealimentación, ya que al aumentar la concentración de 8 a 64 g DQO/L, el rendimiento de hidrógeno se redujo de 2.8 a 1.1 mol H₂/mol de glucosa.

La inhibición por sustrato es un fenómeno ampliamente reportado por distintos estudios [18, 19, 111, 161, 170], el cual resulta en cambios de las rutas metabólicas de la célula. Bacterias como *Clostridium* tienen dos diferentes rutas metabólicas para producir hidrógeno durante la fermentación de carbohidratos: acidogénesis, el cual produce principalmente AGV como el ácido acético y el ácido butírico. Y solvetogénesis, donde se generan solventes tal como acetona y etanol. Así, cuando las condiciones ambientales son favorables, *Clostridium* es capaz de modificar su metabolismo a cualquiera de esas rutas. Sin embargo, sólo durante la acidogénesis se producen los más altos rendimientos de hidrógeno [127]. Por ejemplo; *C. acetobutylicum*, cambia su metabolismo de producción de AGV a producción de alcohol, como una respuesta de adaptación de la célula para eliminar los efectos inhibitorios provocados por el sustrato, resultando en bajos rendimientos de hidrógeno [171, 172]. Lo anterior es debido a que durante la oxidación de la materia orgánica mediante fermentación butírica, y principalmente a altas concentraciones de sustrato, se produce un alto rendimiento de NADH, en la cual parte del NADH incapaz de ser utilizado por la célula se torna en exceso. En ese momento el metabolismo de la célula cambia, y la producción de ácido butírico es reemplazada por la de ácido propiónico y/o etanol para mantener la proporción NAD^+/NADH [78].

Por otro lado, Van Ginkel *et al.* [162] sugieren que la producción de hidrógeno puede ser baja a altas concentraciones de sustrato, como un resultado de la inhibición por la acumulación de AGV. Se ha reportado que la producción de AGV durante la acidogénesis puede estimular, inhibir o incluso intoxicar a las bacterias fermentativas dependiendo de la concentración [173]. El efecto de los AGV sobre las bacterias fermentativas está asociado con los valores de pH del medio. Se presume que los AGV en su forma no disociada, pueden libremente permear a través de la membrana celular de la bacteria, así, al penetrar la membrana plásmica se disocia según el pH interno de la célula [99]. Para evitar condiciones fisiológicas no favorables, la célula debe disponer de energía para enviar iones y amortiguar el pH, disponiendo de la energía usada por la bacteria para el crecimiento, lo cual disminuye la velocidad de crecimiento bacteriano [174]. Sin embargo, a altas concentraciones de AVG disociados en el cultivo, el esfuerzo iónico incrementa, lo cual generalmente resulta en lisis celular (destrucción de la membrana) [175]. Por lo tanto, altas concentraciones de AGV puede resultar en la

inhibición del crecimiento de las bacterias, inhibiendo a su vez la producción de hidrógeno en el sistema [168].

No obstante, en el presente trabajo de investigación, se presume que el aumento en la producción de etanol, acético y propiónico, fue debido a un cambio en el metabolismo microbiano provocado por el incremento de la concentración de sustrato, más que por inhibición de metabolitos producidos. Así mismo, la disminución del rendimiento se atribuye al consumo de hidrógeno para la formación de moléculas de ácido propiónico y etanol. En la Figura 3.1 se muestra el comportamiento del rendimiento de hidrógeno y la distribución de los metabolitos solubles producidos bajo las diferentes concentraciones de sustrato evaluadas en este estudio. Se puede observar que el rendimiento de hidrógeno disminuye, al mismo tiempo que la fermentación butírica es inhibida y se activan la fermentación propiónica y etílica.

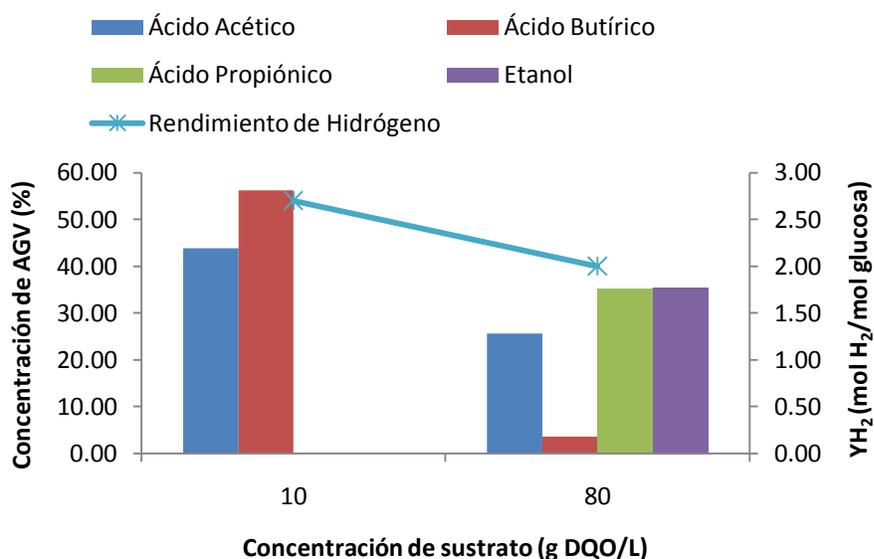


Figura 3.1 Efecto del aumento de la concentración de sustrato sobre el rendimiento de hidrógeno y la distribución en el efluente de los metabolitos solubles producidos

Reportes de estudios anteriores sugieren que una concentración de 1232.4 mg/L como la obtenida en este estudio a 80 g DQO/L (Figura 3.2), no es suficiente para provocar inhibición por acumulación de butírico, Zheng y Yu [175] mediante adición de ácido butírico al sistema, observaron que una concentración de 6270 mg/L solo inhibe ligeramente la producción de hidrógeno, 12540 mg/L impone un moderada inhibición y que se requieren de 25080 mg/L para provocar una fuerte influencia inhibitoria sobre la producción de hidrógeno y la degradación de sustrato. Wang *et al.* [168] observaron que con una concentración de 26433 mg/L de ácido butírico, se inhibe casi por completo la producción de hidrógeno, pasando de 2.2 (sin ácido butírico externo) a 0.2 mol H₂/mol glucosa. La literatura sugiere que los efectos inhibitorios del ácido butírico sobre la capacidad de las bacterias de producir hidrógeno son mayores que las del ácido acético, ácido propiónico y etanol [162, 168, 176].

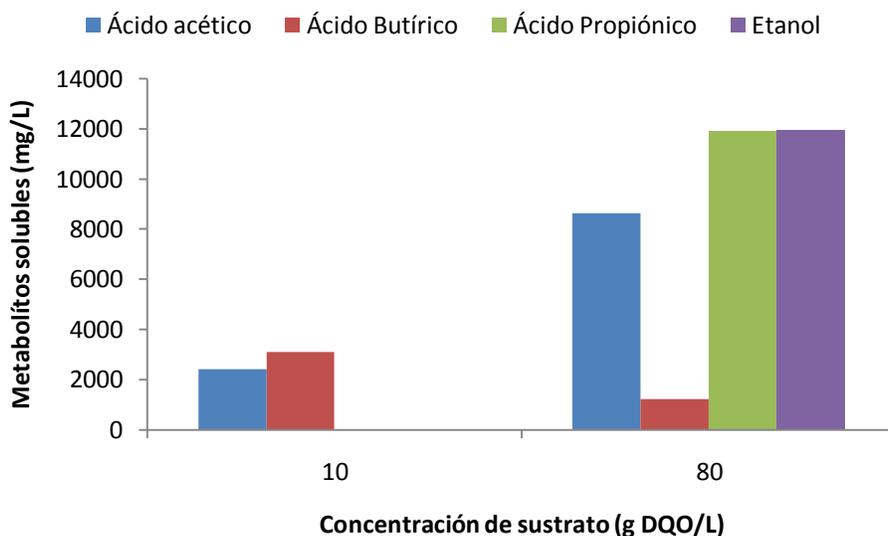


Figura 3.2 Efecto del aumento de la concentración de sustrato sobre la producción de metabolitos solubles en el efluente

La producción de etanol en este estudio fue de 11959.6 mg/L (199 mmol) a 80 g QO/L, lo que nos permite suponer que la contribución del etanol en la reducción de

rendimiento de hidrógeno fue mediante el consumo de iones H^+ , y que no provocó inhibición en el crecimiento de las bacterias por acumulación, Wang et al. [168] reportaron que el etanol es el metabolito con el menor efecto inhibitorio comparado con los AGV, y lo evaluaron aumentando de manera deliberada la concentración de etanol en el sistema (de 0 a 300 mmol), observando que el rendimiento de hidrógeno reduce de 2.2 a 1.5 mol H_2 /mol de glucosa. Mientras que cuando aumentaron la concentración de acético, propiónico y butírico de 0 a 300 mmol, el rendimiento de hidrógeno disminuyó de 2.2 a 0.4, 0.2 y 0.2 mol H_2 /mol de glucosa respectivamente.

3.2. Desempeño del RCTA operado a diferentes tiempos de retención hidráulica

En algunos estudios se ha observado que la producción de ácido propiónico y etanol puede ser reducida mediante la variación del TRH [112, 118, 157], Mitchell *et al.* [112] observaron que al aumentar el TRH de 8 a 12 h en un reactor acidogénico operado a distintas concentraciones de sustrato (30, 40 y 50 g DQO/L), la producción de ácido propiónico y etanol disminuyeron mientras que la producción de ácido butírico aumentó. En este estudio, los principales metabolitos solubles producidos a TRH de 6, 9 y 12 horas para la mayor concentración, es decir, 80 g DQO/L, fueron ácido propiónico, ácido acético y etanol, mientras que el ácido butírico se produjo en menor cantidad (Figura 3.3). Un aspecto relevante fue el hecho de no detectar metano, lo que indica que las bacterias metanogénicas fueron satisfactoriamente eliminadas con el pretratamiento térmico.

El análisis de la distribución de los metabolitos solubles producidos, muestra que la fermentación ácido propiónica fue el tipo de fermentación predominante en todos los valores de TRH evaluados, se observó que la distribución del ácido propiónico se mantuvo similar y predominante, y representó entre los metabolitos de efluente el 35.4, 35.3 y 36.5% para TRH de 6, 9 y 12 h respectivamente (Figura 3.3). La producción de ácido propiónico ha sido asociada con el consumo de hidrógeno [14, 23, 78], lo cual representa pérdidas en el rendimiento del sistema.

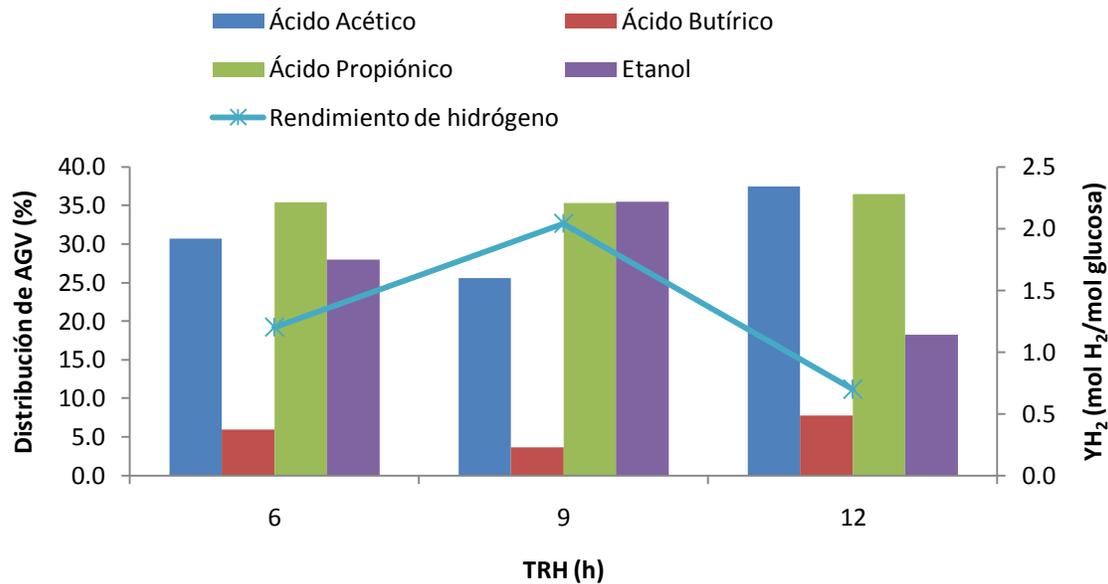


Figura 3.3 Efecto del TRH sobre el rendimiento de hidrógeno y la distribución de los metabolitos solubles producidos durante la fermentación a 80 d DQO/L.

Debido a que en el efluente no se detectó formación de ácido láctico, y la distribución de ácido propiónico fue similar en los tres TRH evaluados, se presume que la producción de ácido propiónico provino de bacterias productoras de hidrógeno, las cuales debido a la alta concentración de sustrato, cambiaron su metabolismo de producción de ácido butírico y ácido acético a ácido propiónico y ácido acético. Investigaciones anteriores [76, 83, 119, 124] sugieren que la producción de ácido propiónico mediante bacterias especializadas en la producción de ácido propiónico es sensible al TRH debido a la selección microbiana. Esto resultados son consistente con algunos estudios [151, 177] donde la concentración de propionato no varió notablemente dentro del intervalo de 2 a 24 h de TRH.

Reportes de distintos estudios nos indican que la producción de ácido propiónico en reactores acidogénicos con cultivos mixtos, puede llevarse a cabo mediante bacterias productoras de ácido propiónico (no productoras de hidrógeno) y/o mediante bacterias productoras de hidrógeno [78, 82, 93, 109, 178]. Estudios como los de Cha y Noike [76], Hussy *et al.* [83] y Lin y Chang [124] ha atribuido la disminución de la producción de ácido

propiónico a la reducción de la población de bacterias especializadas en la formación de propiónico. Cha y Noike [76] notaron que la producción de ácido propiónico estuvo presente a 24 y 48 h de TR, pero ausente a 12 h de TRH en un reactor RCTA usando almidón como fuente de sustrato. Hussy *et al.* [83] encontraron que una inmediata reducción de propiónico fue provocada en un RCTA con almidón como fuente de sustrato cuando redujeron el TRH a 12h, Lin y Chang [124] observaron una significativa reducción en la producción de propiónico cuando el TRH fue disminuido a 6 h.

Li *et al.* [179] observaron que dentro de un intervalo de TRH evaluado (2, 3, 6, 9, 12 y 24 h) la bacteria *Propionispira arboris* relacionada con la producción de ácido propiónico se mantuvo presente en el reactor a TRH > 6 h, mientras que a 2 y 3 h no fue detectada. Vavilin *et al.* (1995) propusieron un modelo asumiendo que las bacterias productoras de propiónico presentes en el reactor, pueden competir por glucosa con las bacterias productoras de butírico y consumir hidrógeno para la producción de ácido propiónico, ácido acético y ácido láctico. En sus resultados sugieren que las bacterias productoras de ácido propiónico incrementan su producción a altos TRH. Se ha observado que la producción de propiónico por bacterias productoras de propiónico generalmente va acompañada de ácido láctico [82, 180, 181]. Por ejemplo, *Clostridium propionicum* posee dos rutas metabólicas propuestas para producir ácido propiónico; directa y aleatoria, sin embargo, independientemente de la ruta metabólica, la producción de propiónico se lleva a cabo mediante la reducción de ácido láctico producido por la misma bacteria [181].

Por otro lado, la distribución de etanol en el efluente, indica que la fermentación etílica fue el segundo tipo de fermentación más importante en el sistema, no obstante, la variación del TRH mostró tener mayor efecto sobre la producción de etanol que sobre la producción de propiónico. En la Figura 3.3, se puede observar un incremento de la concentración de etanol de 27.9 a 35.4% cuando se aumentó el TRH de 6 a 9 h, sin embargo, cuando se aumenta el TRH de 9 a 12 h, se observa una caída en la concentración del etanol de 35.4 a 18.3%. Se ha reportado que en la fermentación es posible generar como máximo dos moléculas de hidrógeno mediante la producción de etanol [23, 78], Ren *et al.* [94] reportaron un rendimiento de hidrógeno de 1.9 mol H₂/mol glucosa en un reactor con glucosa como fuente de sustrato, donde el principal metabolito soluble producido fue etanol. En el presente trabajo de investigación se observó que la

producción de hidrógeno estuvo asociada a la producción de etanol, ya que cuando el TRH fue incrementado de 6 a 9 h, el rendimiento de hidrógeno aumentó de 1.2 a 2.0 mol H₂/mol glucosa, posteriormente una caída en el rendimiento de hidrógeno se registró cuando el TRH se aumentó de 9 a 12 h, pasando de 2 a 0.7 mol H₂/mol glucosa (Figura 3.2). Este comportamiento nos indica que la producción de hidrógeno se llevó a cabo mediante fermentación etílica y que las condiciones de operación del sistema a altas concentraciones de sustrato y TRH entre 6 y 12 h, pueden activar la ruta metabólica del etanol en las bacterias.

Algunos estudios indican que únicamente a valores de pH entre 4.5 y 5, es posible activar el metabolismo de la bacteria para la producción de hidrógeno mediante fermentación etílica [20, 38], en otros estudios incluso se ha propuesto no controlar el pH como una manera económica de producir hidrógeno mediante el metabolismo etílico [78, 136]. Sin embargo en este estudio, a pesar de que el pH se mantuvo controlado a 5.5 ± 0.1 no se pudo evitar la activación del metabolismo etílico, incluso ni con la variación del TRH de 6 a 12 h. No obstante, se observó que si bien la variación del TRH no influye en el cambio del metabolismo microbiano, si influye en el consumo de glucosa y en la producción de etanol, puesto que a 12 h de TRH se registró una caída en la producción (Figura 3.4).

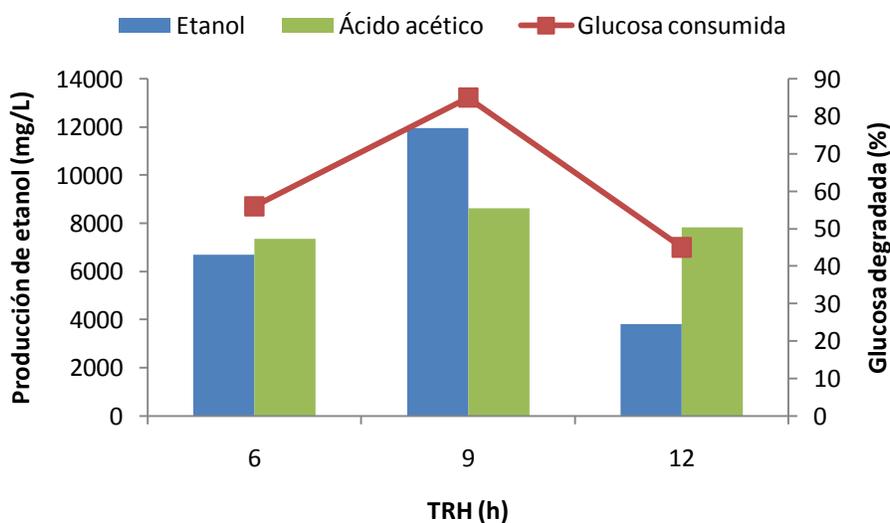


Figura 3.4 Efecto de la variación del TRH sobre la producción de etanol y la glucosa convertida.

La reducción en la producción de etanol mantuvo una relación directa con la cantidad de glucosa degradada (glucosa convertida) por los microorganismos del sistema, los cuales fueron influenciadas por la variación de TRH. A pesar de que en este trabajo de investigación no se determinó la concentración de Sólidos Volátiles Disueltos (SVD) en el reactor, el valor de degradación de azúcar de 85.7% sugiere que hubo una mayor acumulación de biomasa productora de hidrógeno a 9 h de TRH que cuando el reactor fue operado a 6 y 12 h de TRH, en donde se obtuvieron valores de glucosa degradada de 56.6 y 45.2% respectivamente, lo cual explicaría la baja producción de metabolitos solubles a 6 y 12 h de TRH (Tabla 3.2).

La concentración de biomasa es un parámetro operacional importante que afecta tanto la estabilidad del sistema como el rendimiento de hidrógeno [19], sin embargo, la presencia de altas concentraciones de biomasa en el reactor, no garantiza una alta eficiencia en la degradación de la materia orgánica, ni altos rendimientos de hidrógeno. Hafez *et al.* [121] observaron que la concentración de biomasa en el reactor aumentó de 1.4 a 17.0 mg/L cuando aumentaron la concentración de sustrato en el sistema de 8 a 64 g DQO/L. No obstante, la cantidad de glucosa degradada redujo de 99.9 a 40.5% junto con el rendimiento de hidrógeno que pasó de 2.8 a 1.1 mol H₂/mol glucosa.

Tabla 3.2 Resultados obtenidos en el experimento a diferentes tiempos de retención hidráulica.

Parámetros	TRH (h)		
	6	9	12
H ₂ producido (L/lote)	11.4	19.0	7.3
H ₂ en biogás (%)	46.8	47.2	56.7
Y _{H₂} (mol H ₂ /mol glucosa)	1.2	2.0	0.7
Glucosa degradada (%)	56.6	85.7	45.2
*Eficiencia de conversión (%)	30	50	17.5
Acético (mg/L)	7363.71	8630.5	7844.65
Butírico (mg/L)	1429.73	1232.47	1635.45
Propiónico (mg/L)	8478.37	11915.34	7646.17
Etanol (mg/L)	6698.02	11959.62	3823.9
**MS totales (mg/L)	23696.83	33737.93	20950.17

*Asumiendo un máximo de conversión de 4 mol H₂/mol glucosa.

**Metabolitos solubles totales (AGV y etanol)

Chu et al. [182] realizaron un conteo para obtener el número de células/mL tanto de bacterias productoras de hidrógeno como de bacterias totales en un RCTA operado a distintos TRH (6 – 14 h), pH 5.5, 30° C y 10 g DQO/L. El conteo de células productoras de hidrógeno fue de 9.2×10^8 , 8.2×10^8 , 2.8×10^8 y 6.2×10^7 células/mL, a TRH de 6, 8, 12 y 14, respectivamente. Mientras que el conteo de células totales fue de 9.4×10^8 , 9.2×10^8 , 6.5×10^8 y 6.2×10^8 , a TRH de 6, 8, 12 y 14 h, respectivamente. Lo que muestra que el porcentaje de bacterias productoras de hidrógeno disminuyó de 97% a 6 h a 10% a 14 h. En este estudio, se presume que la reducción de porcentaje de glucosa degradada, puede ser el motivo principal por el cual la producción de etanol disminuyó, lo cual pudo ser provocado por la reducción de bacterias productoras de hidrógeno y el incremento de la población de bacterias consumidoras de hidrógeno, como la acetogénicas, lo cual podría explicar el motivo por el cual la producción de ácido acético a 12 h se mantuvo en valores cercanos a los obtenidos a 9 h de TRH.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se pueden mencionar los siguientes puntos:

1. La producción de hidrógeno mediante fermentación acética y butírica en un RCTA con glucosa como fuente de sustrato a condiciones de pH de 5.5 ± 0.1 , 9 h de TRH, 37° C, 190 rpm y concentraciones de sustrato bajas a 10 g DQO/L, presentó resultados competitivos a lo registrado en la literatura.
2. Mediante el pretratamiento térmico a un cultivo mixto, es posible seleccionar bacterias acidogénicas productoras de hidrógeno y eliminar bacterias metanogénicas consumidoras de hidrógeno.
3. Una concentración de sustrato de 80 g DQO/L reduce el metabolismo acidogénico de las bacterias fermentativas activando el metabolismo de solvetogénesis, sin ajustar el pH a valores menores de 5.5 tal como refiere la literatura.
4. La producción de hidrógeno a concentraciones de sustrato altas (80 g DQO/L) mediante fermentación etílica, disminuye los rendimientos que se obtienen comparado con la fermentación butírica.
5. A concentración de sustrato de 80 g DQO/L y 9 h de TRH, se obtuvo un rendimiento de hidrógeno de 2.0 mol H₂/mol glucosa, similar a lo registrado en la literatura.
6. La variación del TRH no influye en el metabolismo bacteriano en concentraciones altas de sustrato (80 g DQO/L), sin embargo, si influye en el rendimiento de hidrógeno mediante la variación en la población bacteriana productora de hidrógeno.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. De la Vega, *Renovar estrategias en México ante la transición energética Mundial*, in *Energía a debate por un nuevo programa energético*. . 2004.
2. *Organisation for economic cooperation and development, Energy: The next fifty years*. 1999.
3. R. Engelman, Fondo de Población de las Naciones Unidas; State of world population 2009 Frente a un mundo cambiante: las mujeres, la población y el clima, *UNFPA*. 2009.
4. F. Torres; E. Gómez, Secretaría de Energía (SENER), *Energías Renovables para el Desarrollo de Mexico* 2006.
5. D. Kammen, Auge de las energías renovables, *Scientific American* 362, 50, 2006.
6. FUNDACIÓN TERRA *Perspectivas Ambiental 24: Biocombustibles*. Barcelona. España., 34, 2002.
7. R. Rozendal, *Hydrogen production through biocatalyzed electrolysis*. 2007. p. 8.
8. T. D. Hayes, H.R.I., J. T. Pfeffer, Y. M. Liu., In Situ Methane Enrichment in Anaerobic Digestion, *Biotechnology and Bioengineering*. 35, 73-86, 1990.
9. M. Torry-Smith, P.S., B. K. Ahring, Purification of Bioethanol Effluent in an UASB Reactor System With Simultaneous Biogas Formation, *Wiley InterScience*. DOI: 10.1002/bit.10734, 2003.
10. M. Krupp; R. Widmann, Biohydrogen production by dark fermentation: Experiences of continuous operation in large lab scale, *International Journal Hydrogen Energy*. 10, 1016, 2008.
11. European-commission, *HyWays: The European Hydrogen Roadmap*, 2007.
12. J. Ramírez-Salgado; A. Estrada-Martínez, Roadmap towards a sustainable hydrogen economy in Mexico, *Journal of Power Sources* 129, 255–263, 2004.
13. United-States-Department-of-Energy, *National Hydrogen Energy Roadmap*, 2002.
14. F.R. Hawkes; R. Dinsdalea, D.L.H., I. Hussyb, Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation, *International Journal of Hydrogen Energy*. 27, 1339 – 1347, 2002.
15. Ueno Y, O.S., Morimoto M., Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost., *Appl Microbiol Biotechnol*. 57, 555–62., 2001.
16. HHP. Fang, H.L., Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture., *Bioresource Technology*. 82, 87–93, 2002.
17. D. Levin; L. Pitt; M. Love, Biohydrogen production: prospects and limitations to practical Application, *International Journal Hydrogen Energy*. 29, 173-185, 2004.
18. S. Kim; S. Han; H. Shin, Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter, *Process Biochemistry* 41, 199–207, 2006.
19. Hisham Hafez, G.N., M. Hesham El. Naggat, Elsayed Elbeshbishy, Bita Baghchehsaraee, Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor, *International Journal of Hydrogen Energy*. 35, 81-92, 2010.
20. N. Ren; B. Wang; J. Huang, Ethanol-type fermentation of carbohydrate wastewater in a high rate acidogenic reactor, *Biotechnology and Bioengineering*. 3, 428–33, 1997.

21. Chang J-S, L.K.-S., Lin P-J, Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors, *International Journal of Hydrogen Energy*. 27, 1167 – 1174, 2002.
22. N. Kataoka; A. Miya; K. Kiriya, Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria, *Water Sci Technol*. 36 (6-7), 41-47, 1997.
23. Freda R. Hawkes, I.H., Godfrey Kyazze, Richard Dinsdale, Dennis L. Hawkes, Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress, *International Journal of Hydrogen Energy*. 32, 172 – 184, 2006.
24. Cheong D-Y, H.C.L., Stevens David K., Production of Bio-Hydrogen by Mesophilic Anaerobic Fermentation in an Acid-Phase Sequencing Batch Reactor, *Biotechnol Bioeng.*, 2006.
25. C. Hallenbeck; R. Benemann, Biological hydrogen production; fundamentals and limiting Processes, *International Journal Hydrogen Energy*. 27, 1185 – 1193, 2002.
26. L. Chenlin, P.F., Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed culture, *Environmental Science and Technology*. 37, 1, 2007.
27. I. Valdez-Vazquez; E. Ríos-Leal; F. Esparza-García; F. Cecchi; H. Poggi-Varaldo, Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime, *International Journal of Hydrogen Energy*. 30(13/14), 1383-1391, 2005.
28. Tumpa Dutta, A.K.D., Debabrata Das, Purification and characterization of [Fe]-hydrogenase from high yielding hydrogen-producing strain, *Enterobacter cloacae* IIT-BT08 (MTCC 5373), *International Journal Hydrogen Energy*. 34, 7530 - 7537, 2009.
29. D. Riviére; V. Desvignes; E. Pelletier; S. Chaussonnerie; S. Guermazi; J. Weissenbach; D. Le Paslier; P. Camacho; A. Sghir, Study of the microbial diversity : a tool for future optimisation of anaerobic digestion, *Presented in Session PP4C – Microbial Diversity 1 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion 23-27 September 2007 Brisbane, Australia*. 2007.
30. C-C. Chen, C.-Y.L., J-S. Chang., Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate, *Appl Microbiol Biotechnol*. 57, 56-64, 2001.
31. O. Mizuno; R. Dinsdale; F.R. Hawkes; D.L. Hawkes, T.N., Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging, *Bioresource Technology*. 73, 59-65, 2000.
32. M. Madigan; J. Mertinko; J. Parker, Biology of Microorganisms, *Prentice Hall. New Jersey, USA*. 1997.
33. H. Liu; H. Fang, Hydrogen production from wastewater by acidogenic granular sludge, *Water Science and Technology*. 47, 153–158, 2002.
34. B.H. Svensson, A.K., *Dark fermentation for hydrogen production from organic wastes*. Lens P, Westermann P, Harberbauer M, Moreno A ed, ed. B.f.f.c.r.e.f.b. fermentation. 2005: UK: IWA Publishing.
35. J. A. Rodríguez, Tratamiento anaerobio de aguas residuales, *Universidad del Valle. Cali, Colombia*.
36. Liu., H., Bio-Hydrogen production from carbohydrate-containing wastewater, *PhD. Thesis, University of Hong Kong, Hong Kong.*, 2002.
37. C. Aceves-Lara, E.L., P. Buffiere, N. Bernet, J. Steyer, Experimental determination by principal component analysis of a reaction pathway of

- biohydrogen production by anaerobic fermentation, *Chem. Engineering and Processing*. 47, 1968–1975, 2008.
38. L. Wang; Q. Zhou, Avoiding propionic acid accumulation in the anaerobic process for biohydrogen production, *Biomass and Bioenergy* 2006.
 39. Chang Jui Jen, C.-H.C., Ping-Chi Hsu, Sian-Jhong Yu, Wei-En Chen, Jiunn-Jyi Lay, Chieh-Chen Huang, Fu-Shyan Wen., Flow-FISH analysis and isolation of clostridial strains in an anaerobic semi-solid bio-hydrogen producing system by hydrogenase gene target, *Appl Microbiol Biotechnol*. DOI 10.1007/s00253-006-0740-8, 2006.
 40. A. Bedoya; J. Castrillon; J. Ramirez; J. Vasquez; M. Zabala, Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte, *DYNA*. 75, 137-157, 2008.
 41. Vignais PM, B.B., Meyer J., Classification and phylogeny of hydrogenases., *FEMS Microbiol Rev*. 25, 455–501, 2001.
 42. Das D, D.T., Nath K, Kotay SM, Das AK, Veziroglu TN., The role of Fe-hydrogenase in biological hydrogen production., *Curr Sci*. 80, 1627–37., 2006.
 43. K. Gutekunst; D. Hoffmann; M. Iommer; M. Egert; I. Suzuki; R. Schulz-Friedrich; J. Appel, Metal dependence and intracellular regulation of the bidirectional NiFe-Hydrogenase in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *International Journal Hydrogen Energy*. 31, 1452 - 1459, 2006.
 44. E. Franchi; C. Tosi; G. Scolla; G. Penna; F. Rodriguez; M. Pedroni, Metabolically engineered *Rhodobacter sphaeroides* RV strains for improved biohydrogen photoproduction combined with disposal of food wastes, *Marine Biotechnology*. 6, 552-565, 2004.
 45. Jayshree Mishra, S.K., Narendra Kumar, Ananta K. Ghosh, Debabrata Das., Molecular cloning, characterization, and overexpression of a novel [Fe]-hydrogenase isolated from a high rate of hydrogen producing *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 324, 679–685, 2004.
 46. D. Dutta; D. De; S. Chauduri; S. Bhattacharya, Hydrogen production by cyanobacteria, *Microbial Cell Factories*. 4, 36, 2005.
 47. Ji Hye Jo, C.O.J., Seung Yoon Lee, Dae Sung Lee, Jong Moon Park., Molecular characterization and homologous overexpression of [FeFe]-hydrogenase in *Clostridium tyrobutyricum* JM1, *International Journal Hydrogen Energy*. 35, 1065 - 1073, 2010.
 48. D. M. Heinekey, Hydrogenase enzymes: Recent structural studies and active site models, *Journal of Organometallic Chemistry*. 294, 2671–2680, 2009.
 49. LT. Angenent; K. Karim; M.H. Al-Dahhan; B.A. Wrenn; R. Domiguez-Espinosa, Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater, *trends Biotechnol*. 22, 477–85, 2004.
 50. Xiaobing Wu, Y.L., Qianyi Li, Juan Zhou, Minnan Long, Characterization and cloning of oxygen-tolerant hydrogenase from *Klebsiella oxytoca* HP1, *Research in Microbiology*. 1-7, 2011.
 51. K. Schutz; T. Happe; O. Troshina; P. Lindblad; E. Leitao; P. Oliveira; P. Tamagnini, Cyanobacterial H₂ production, a comparative analysis, *Planta* 218. 3, 350-359, 2004.
 52. A. Volbeda; M.H. Charon; C. Piras; E.C Hatchikian; M. Frey; J.C. Fontecilla Camps, Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*, *Nature*. 373, 1995.

53. Happe, T., Hemschemeier, A., Winkler, M., Kaminski, A., Hydrogenases in green algae: do they save the algae's life and solve our energy problems?, *Trends Plant Sci.* 7, 246-250, 2022.
54. E. Hidalgo; J.M. Palacios; J. Murillo; T. Ruiz-Argueso, Nucleotide sequence and characterization of four additional genes of the hydrogenase structural operon from *Rhizobium leguminosarum* bv *Viciae*, *J. Bacteriol.* 174, 4130-4139, 1992.
55. T. G. Sokolova; C. Jeanthon, N.A.K.N.A.C.A.V.L.E.S.E.A.B.-O., The first evidence of anaerobic co oxidation coupled with H₂ production by a hyperthermophilic archaeon isolated from a deepsea hydrothermal vent, *Extremophiles.* 8, 317-323, 2004.
56. Colbeau;, P.M.V.A., Molecular biology of microbial hydrogenases, *Curr. Issues Mol. Biol.* 6, 159-188, 2004.
57. Herbert H.P. Fang, H.Z., Tong Zhang, Phototrophic hydrogen production from glucose by pure and co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides*, *International Journal Hydrogen Energy.* 31, 2223 – 2230, 2006.
58. Holt JG, K.N., Sneath PH, Staley JT, Williams ST, Bergey's manual of determinative bacteriology., 9th ed., Baltimore: Williams & Wilkins Co;, 1994.
59. M. Guiral; P. Tron; V. Belle; C. Aubert; C. Le´ger; B. Guigliarelli; M.R.G. Ortoni, Hyperthermostable and oxygen resistant hydrogenases from a hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: physicochemical properties, *International Journal Hydrogen Energy.* 31, 1424-1431, 2006.
60. J. Meyer, Primary structure of hydrogenase I from *Clostridium pasteurianum*, *Biochemistry.* 30, 9697–704, 1991.
61. Von Abendroth G, S.S., Silakov A, Croux C, Soucaille P, Girbal L., Optimized over-expression of [FeFe] hydrogenases with high specific activity in *Clostridium acetobutylicum.*, *International Journal Hydrogen Energy.* 33, 6076–81., 2008.
62. J.J. Lay, Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen, *Biotechnol. Bioeng.* 68 (3), 269 – 278, 2000.
63. Ueno Y, O.S., Morimoto M., Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture., *J Ferment Technol* 82(2), 194–197., 1996.
64. L. Alzate; P. Sebastian; A. Perez; D. Eapen, Comparison of two anaerobic systems for hydrogen production from the organic fraction of municipal solidwaste and syntheticwastewater, *International Journal Hydrogen Energy.* 32, 3141-3146, 2007.
65. Nanqi Ren, D.X., Bruce E. Rittmann, Lihua Zhao, Tianhui Xie and Xin Zhao, Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production, *Environmental Microbiology.* 9(5), 1112–1125, 2007.
66. Jui-Jen Chang, P.-C.H., Chi-Wa Choi, Sian-Jhong Yu, Cheng-Yu Ho, Wei-En Chen, Jiunn-Jyi Lay, Chieh-Chen Huang, Fu-Shyan Wen, Detection of the clostridial hydrogenase gene activity as a bio-index in a molasses wastewater biohydrogen producing system by real time PCR and FISH/ flow cytometry, 2006.
67. S. L. Li; J. S. Lin; Y. H. Wang; Z. K. Lee; S. C. Kuo; I. C. Tseng; S. S. Cheng, Microbial diversity of I-CSTR hydrogen fermentor feeding with kitchen waste, *Presented in Session PP7A – Biohydrogen 2 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestion, 23-27 September 2007, Brisbane Australia.* 2007.
68. Fang HHP, L.H., Zhang T., Characterization of a hydrogen-producing granular sludge., *Biotechnol Bioeng.* 78, 44–52., 2001.
69. H.H.P. Fang; H. Liu; T. Zhang, Characterization of a hydrogen producing granular sludge, *Biotechnol. Bioeng.* 78, 44-52, 2001.

70. R. Yan; C. Zhu; C. Golembosky; J. Chen, Expression of Solvent-Forming Enzymes and Onset of Solvent Production in Batch Cultures of *Clostridium beijerinckii* ("*Clostridium butylicum*"), *Applied and Environmental Microbiology*. 54 (3), 642-648, 1988.
71. W.H. Peterson; E.B. Fred, Butyl-acetone fermentation of corn meal: interrelations of substrate and products, *Ind. Eng. Chem.* 24, 237-242, 1932.
72. R. Davies; M. Stephenson, Studies on the acetonebutyl alcohol fermentation. 1. Nutritional and other factors involved in the preparation of active suspensions of *Cl. acetobutylicum* (Weizmann), *Biochem. J.* 35, 1320-1331, 1941.
73. Dabrock B, B.H., Gottschalk G., Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum.*, *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 1233-9, 1992.
74. N.Q. Ren; H. Chua; S.Y. Chan; Y.F. Tsang; Y.J. Wang; N. Sin, Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors, *Bioresource Technology*. 98, 1774-1780, 2006.
75. A. Cohen; R.J. Zoetemeyer; A. Van Deursen, J.G.V.A., Anaerobic digestion of glucose with separated acid production and methane formation, *Water Res.* 13, 571-580, 1979.
76. G.C. Cha; T. Noike, Effect of rapid temperature change and HRT on anaerobic acidogenesis, *Water Sci. and Technol.* 36 (6-7), 247- 253, 1997.
77. R.J. Zoetemeyer; J.C. Van Den Heuvel; A. Cohen, pH influence on acidogenic dissimilation of glucose in an anaerobic digester, *Water Res.* 16 (3), 303-311, 1982.
78. N. Ren; D. Zhao; X. Chen; J. Li, Mechanism and controlling strategy of the production and accumulation of propionic acid for anaerobic wastewater treatment, *Science In China* 45 (3). 2002.
79. A. Cohen, Influence of phase separation on the anaerobic digestion of glucose-II. Stability and kinetic responses to shock loadings, *Water Res.* 16, 449-455, 1982.
80. Hanaki K, H.S., Matsuo M., Protection of methanogenic bacteria from low pH and toxic materials by immobilization using polyvinyl alcohol., *Water Research*. 877-85, 1994.
81. Hanaki K, H.S., Matsuo M., Selective use of microorganisms in anaerobic treatment process by application of immobilization, *Water Research*. 993-6, 1994.
82. V. A. Vavilin; S. V. Rytow, L.Y.L., Modelling hydrogen partial pressure change as a result of competition between the butyric and propionic groups of acidogenic bacteria, *Bioresour Technol.* 54, 171-7, 1995.
83. I. Hussy; F.R. Hawkes; R. Dinsdale; D.L. Hawkes, Continuous Fermentative Hydrogen Production from a Wheat Starch Co-Product by Mixed Microflora, *Biotechnol Bioeng.* 84, 619-626, 2003.
84. G. Fynn; M. Syafila, Hydrogen regulation of acetogenesis from glucose by freely suspended and immobilized acidogenic cells in continuous culture, *Biotechnology Letters*. 12, 621-6, 1990.
85. Boone., D.R., Terminal reactions in the anaerobic digestion of animal waste., *Applied and Environmental Microbiology*. 53, 57-64, 1982.
86. S. R. Harper, F.G.P., Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment., *Biotechnology and Bioengineering*. 28, 585-602, 1986.
87. F.E Mosey; X.A. Fernandes, Patterns of hydrogen in biogas from the anaerobic digestion of milk-sugars, *Water Science and Technology*. 21, 187-96, 1989.

88. B. Inanc; S. Matsui; S. Ide, Propionic acid accumulation and controlling factors in anaerobic treatment of carbohydrate: effects of H₂ and pH, *Water Science and Technology*. 34, 34:317–25, 1996.
89. B. Inanc, S.M., S. Ide, Propionic acid accumulation in anaerobic digestion of carbohydrates: an investigation on the role of hydrogen gas, *Wat. Sci. Tech.* . 40 (1), 93 -100, 1999.
90. G. Dinopoulou; T. Rudd; J.N. Lesler, Anaerobic acidogenesis of a complex wastewater: I. The influence of operational parameters on reactor performance, *Biotechnology and Bioengineering*. 31, 958–64, 1988.
91. A. Cohen; J.M. Van Gemert; R.J. Zoetemeyer; A.M. Breure, Main characteristics and stoichiometric aspects of acidogenesis of soluble carbohydrate containing wastewater, *Process Biochemistry*. 19, 228–37, 1984.
92. N. Ren; W. Guo; B. Liu; G. Cao; J. Tang, Biological hydrogen production from organic wastewater by dark fermentation in China: Overview and prospects, *Front. Environ. Sci. Engin.* 3(4): 375–379 DOI 10.1007/s11783-009-0148-7, 2009.
93. N. Ren, X.D.B.E.L.L.Z.R.X.T.Z.X., Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production, *Environmental Microbiology*. 9(5), 1112–1125, 2007.
94. N.Q. Ren; W.Q. Guo; X.J. Wang; W.S. Xiang; B.F. Liu; X.Z. Wang; J. Ding; Z.B. Chen, Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production, *international journal of hydrogen energy*. 33, 4318 – 4324, 2008.
95. N. Ren; B. Wang; J. Huang, Ethanol type fermentation of carbohydrate wastewater in a high rate acidogenic reactor, *Biotechnol. Bioeng.* 54, 428 - 433, 1997.
96. S. K. Khanal; W. H. Chen; L. Li; Shihwu Sung, Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products, *International Journal Hydrogen Energy*. 29, 1123 – 1131, 2004.
97. J.-H. Wu, C.-Y.L., Biohydrogen production by mesophilic fermentation of food wastewater, *Wat. Sci. Tech.* 49 (5), 223-228, 2004.
98. M. H. Hwang; N. J. Jang; S. H. Hyun; I. S. Kim, Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH, *Journal of Biotechnology*. 111, 297–309, 2004.
99. G. Gottschalk, *Bacterial Metabolism. 2nd Ed. Springer-Verlag*. 1986, NewYork.
100. C. Lin; P. Fang, Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed culture, *Environmental Science and Technology*. 37, 1, 2007.
101. Y.K. Oh; S.H. Kim; M.S. Kim; S. Park, Thermophilic Biohydrogen Production From Glucose With Trickle Biofilter, *Wiley InterScience*. DOI: 10.1002/bit.20269, 2004.
102. P.Y. Lin; L.M. Whang; Y.R. Wu; W.J. Ren; C.J. Hsiao; S.L. Li; J.S. Chang, Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: metabolic study and mathematical model simulation, *Int. J. Hydrogen Energy*. 32 (12), 1728–1735, 2007.
103. H.S. Lee; M.B. Salerno; B.E. Rittmann, Thermodynamic evaluation on H₂ production in glucose fermentation, *Environ. Sci. Technol.* 42 (7), 2401–2407, 2008.
104. H.S. Lee; B.E. Rittmann, Evaluation of metabolism using stoichiometry in fermentative biohydrogen, *Biotechnol. Bioeng.* 102 (3), 749–758, 2009.
105. J.R. Andreesen; H. Bahl; G. Gottschalk, *Introduction to the physiology and biochemistry of the genus Clostridium. In: Minton, N.P., Clarke, D.J. (Eds.), Biotechnology Handbooks: Clostridia. Plenum Press*. 1989, New York.

106. L. Girbal; P. Soucaille, Regulation of solvent production in *Clostridium acetobutylicum*, *Trends Biotechnol.* 16 (1), 11–16, 1998.
107. L.M. Whang; C.J. Hsiao; S.S. Cheng, A dual-substrate steady-state model for biological hydrogen production in an anaerobic hydrogen fermentation process, *Biotechnol. Bioeng.* 95 (3), 492–500, 2006.
108. S. Adav; D. Lee; A. Wang; N. Ren, Functional consortium for hydrogen production from cellobiose: concentration-to-extinction approach., *Bioresour. Technol.* 100 (9), 2546–2550., 2009.
109. Bai; S.S. Cheng,, S.L.L.L.M.W.Y.C.C.Y.H.W.Y.F.W.C.J.H.I.C.T.M.D., Effects of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenation performance and microbial ecology of bioreactors fed with glucose–peptone and starch–peptone, *International Journal Hydrogen Energy.* 35, 6 1 – 7 0, 2010.
110. L.M. Whang; C.A. Lin; I.C. Liu; C.W. Wua; H.H. Cheng, Metabolic and energetic aspects of biohydrogen production of *Clostridium tyrobutyricum*: The effects of hydraulic retention time and peptone addition, *Bioresource Technology.* doi:10.1016/j.biortech.2011.03.101, 2011.
111. Van Ginkel SW, L.B., Increased biological hydrogen production with reduced organic loading., *Water Res.* 39, 3819–26, 2005.
112. R. Mitchell; K. Kim; B. Jeon; B. Sang, Continuous hydrogen and butyric acid fermentation by immobilized *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755: Effects of the glucose concentration and hydraulic retention time, *Bioresource Technology.* 100, 5352–5355, 2009.
113. Moon H. Hwang, N.J.J., Seung H. Hyun, In S. Kim., Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH, *Journal of Biotechnology.* 111, 297–309, 2004.
114. S. VanGinkel and, S.S., Biohydrogen Production as a Function of pH and Substrate Concentration, *Environmental Science and Technology.* 35, 4726-4730, 2001.
115. F. Monot; J.M. Engasser; H. Petitdemange, Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*, *Applied Microbiology Biotechnology.* 19 (6), 422–426, 1984.
116. B.S. Fernandes; D.V. Vich; R.H. Idagawa; M.B.A. Varesche; W.D. Marra Jr; M. Zaiat, Influence of hydraulic retention time and support material for biomass immobilization on hydrogen production in an anaerobic packed-bed bioreactor, *Presented in Poster Session PT01 – Biohydrogen 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestions, 23-27 September 2007, Brisbane, Australia.* 2007.
117. CHU Chunfeng, E.Y., INAMORI Yuhei, KONG Hainan, Effect of hydraulic retention time on the hydrogen yield and population of *Clostridium* in hydrogen fermentation of glucose, *Journal of Environmental Sciences.* 21, 424–428, 2009.
118. K.S. Fan; N.R. Kan; J.J. Lay, Effect of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenesis in CSTR, *Bioresource Technology.* 97, 84–89, 2006.
119. Z. Zhang; K. Show; J. Tay; D. Liang; D. Lee; W. Jiang, Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community, *Process Biochemistry* 41, 2118–2123, 2006.
120. G. Kyazze; N. Martinez-Perez; R. Dinsdale; G.C. Premier; F.R. Hawkes; A.J. Guwy, Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production, *Biotechnol Bioeng.* 93(5), 971–9, 2006.
121. H. Hafez; G. Nakhla, M.H.E.I.N.E.E.B.B., Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor, *International Journal of Hydrogen Energy.* 35, 81-92, 2010.

122. S. W. Van Ginkel; B.E. Logan, Increased biological hydrogen production with reduced organic loading, *Water Res.* 39, 3819–26, 2005.
123. G. Antonopoulou; H.N. Gavala; I.V. Skiadas; K. Angelopoulos; G. Lyberatos, Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass, *Bioresour Technol.* 99, 110 - 9, 2008.
124. C.Y. Lin; R.C. Chang, Fermentative hydrogen production at ambient temperature, *International Journal Hydrogen Energy.* 29(7), 715-720, 2004.
125. C.C. Chen; C.Y. Lin; M.C. Lin, Acid-Base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process, *Appl Microbiol Biotechnol.* 58(2), 224 - 228, 2002.
126. S. Venkata Mohan; V. Lalit Babu; P.N. Sarma, Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor (AnSBR): Effect of organic loading rate, *Enzyme and Microbial Technology.* 41, 506–515, 2007.
127. Valdez-Vazquez I. , M.P.-V.H., Hydrogen production by fermentative consortia, *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 13, 1000–1013, 2009.
128. Y.J. Lee; T. T. Miyahara; T. Noike, Effect of pH on microbial hydrogen fermentation, *Journal of chemical technology and biotechnology.* 77, 694-698, 2002.
129. Y. K. Oh; E.H. Seol; E.Y. Lee; S. Yokoyama, Fermentative hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* P4, *International Journal Hydrogen Energy.* 27(11/12), 1373-1379, 2002.
130. J.I. Horiuchi; T. Shimizu; K. Tada; T. Kanno; M. Kobayashi, Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control, *Biosource Technol.* 82(3), 209-213, 2002.
131. C.Y. Lin; R.C. Chang, Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose, *J Chem Technol Biotechnol.* 74, 498–500, 1999.
132. X. Zheng; H. Yu, Biological Hydrogen Production from an Anaerobic Fermentor at Various Agitation Speeds, *Presented in Poster Session PT01 – Biohydrogen 11th IWA World Congress on Anaerobic Digestions.* 23-27 2007.
133. H. Yu; Z. Zhu; W. Hu; H. Zhang, Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures, *International Journal Hydrogen Energy.* 27, 1359 – 1365, 2002.
134. Y. Mu; H. Yu; G. Wang, Evaluation of three methods for enriching H₂-producing cultures from anaerobic sludge, *Enzyme and Microbial Technology.* 40, 947–953, 2007.
135. Lay., J., Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose., *Biotechnol Bioeng.* 74, 280–7, 2001.
136. Nan-Qi Ren, W.-Q.G., Xiang-Jing Wang, Wen-Sheng Xiang, Bing-Feng Liu, Xing-Zu Wang, Jie Ding, Zhao-Bo Chen., Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production, *international journal o f hydrogen energy.* 33, 4318 – 4324, 2008.
137. H. Liu; G. Wang; D. Zhu; G. Pan, Enrichment of the hydrogen-producing microbial community from marine intertidal sludge by different pretreatment methods, *International Journal Hydrogen Energy.* 34, 9696 - 9701, 2009.
138. M. Cai; J. Liu; Y. Wei, Enhanced Biohydrogen Production from Sewage Sludge with Alkaline Pretreatment, *Environmental Science and Technology.* 38, 3195-3202, 2004.
139. L. Ozkan; T. H. Erguder; G. N. Demirer, Effects of pretreatment methods on solubilization of beet-pulp and bio-hydrogen production yield, *international Journal Hydrogen Energy.* 36, 382-389, 2011.

140. Chun-zhao Liu, X.-y.C., Improved hydrogen production via thermophilic fermentation of corn stover by microwave-assisted acid pretreatment, *International Journal Hydrogen Energy*. 35, 8945 - 8952, 2010.
141. L. Dong; Y. Zhenhong; S. Yongming; M. Longlong, Evaluation of pretreatment methods on harvesting hydrogen producing seeds from anaerobic digested organic fraction of municipal solid waste (OFMSW), *International Journal Hydrogen Energy*. 35, 8234 - 8340, 2010.
142. B. Hu; S. Chen, Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation, *International Journal Hydrogen Energy*. 32, 3266 - 3273, 2007.
143. S. Chang; J. Li; F.Liu, Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge, *Renewable Energy*. 36, 1517 - 1522, 2011.
144. H. Wang; M. Fang; Z. Fang; H Bu, Effects of sludge pretreatments and organic acids on hydrogen production by anaerobic fermentation, *Bioresource Technology*. 101, 8731–8735, 2010.
145. Sang-Hyoun Kim, H.-S.S., Effects of base-pretreatment on continuous enriched culture for hydrogen production from food waste, *International Journal Hydrogen Energy*. 33, 5266 -5274, 2008.
146. C.H. Ting; K.R. Lin; D.J. Lee; J.H. Tay, Production of hydrogen and methane from wastewater sludge using anaerobic fermentation, *Water Sci. and Tec*. Vol 50 No 9, 223–228, 2004.
147. Cheong DY, H.C., Feasibility of hydrogen production in thermophilic mixed fermentation by natural anaerobes, *Bioresour Technol*. 98, 2229–39, 2007.
148. Oh SE, V.G.S., Logan BE., The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production., *Environ Sci Technol*. 37(22):, 5186–90., 2003.
149. C.Z. Liu; X.Y. Cheng, Improved hydrogen production via thermophilic fermentation of corn stover by microwave-assisted acid pretreatment, *International Journal Hydrogen Energy*. 35, 8945 - 8952, 2010.
150. R. Nandi; S. Sengupta, Microbial production of hydrogen: an overview, *Crit Rev Microbiol*. 24(1), 61–84, 1998.
151. C.C. Chen; C.Y. Lin, Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogenproducing reactor, *Adv Environ Res*. 7(3), 695–9, 2003.
152. C.C. Chen; C.Y. Lin; J.S. Chang, Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate, *Appl Microbiol Biotechnol*. 57, 56-64, 2001.
153. Lin CY, C.R., Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose., *J Chem Technol Biotechnol*. 74, 498–500, 1999.
154. Han SK, S.H., Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste, *Int J Hydrogen Energy*. 29, 569–77., 2004.
155. M. Badiiei; J. M. Jahim; N. Anuar; S. R. S. Abdullah, Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production from palm oil mill effluent in anaerobic sequencing batch reactor, *International Journal Hydrogen Energy*. 36, 5912-5919, 2001.
156. A. Karlsson; L. Vallin; J. Ejlertsson, Effects of temperature, hydraulic retention time and hydrogen extraction rate on hydrogen production from the fermentation of food industry residues and manure, *International Journal Hydrogen Energy*. 33, 953 - 962, 2008.
157. G. Buitrón; C. Carvajal, Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration,

- temperature and hydraulic retention time, *Bioresource Technology*. 101, 9071–9077, 2010.
158. H. Poggi-Varaldo; J. Oleszkiewicz, Anaerobic co-composting of municipal solid waste and waste sludge at high total solid levels, *Environ Technolgy*. 13, 409–21, 1992.
159. J. M. Medina; L.F. Barahona, *Automatización de la salida de los gases producidos por un bioreactor mediante un PLC*. 2010, Instituto Tecnológico Superior de Progreso y Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán: Mérida, Yucatán.
160. C.A. Aceves-Lara; E. Latrille; P. Buffiere; N. Bernet; J. Steyer, Experimental determination by principal component analysis of a reaction pathway of biohydrogen production by anaerobic fermentation, *Chemical Engineering and Processing*. 47, 1968–1975, 2008.
161. G. Antonopoulou; H.N. Gavala; I.V. Skiadas; G. Lyberatos, Effect of substrate concentration on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract, *International Journal Hydrogen Energy*. 36, 4843 - 4851, 2011.
162. S.W. Van Ginkel; S. Sung, Biohydrogen Production as a Function of pH and Substrate Concentration, *Environmental Science and Technology*. 35, 4726-4730, 2001.
163. L. Shen; D.M. Bagleyb; S.N. Lissc, Effect of organic loading rate on fermentative hydrogen production from continuous stirred tank and membrane bioreactors, *International Journal Hydrogen Energy*. 34, 3689 - 3696, 2009.
164. Z. Li; H. Wang; Z. Tang; X. Wang; J Bai, Effects of pH value and substrate concentration on hydrogen production from the anaerobic fermentation of glucose, *International Journal Hydrogen Energy*. 33, 7413 - 7418, 2008.
165. J. J. Zhang; X. Y. Li; S. E. Oh; B. E. Logan, Physical and hydrodynamic properties of flocs produced during biological hydrogen production, *Biotechnol Bioeng*. 88, 854–60, 2004.
166. X. Wu; Y. Liang; Q. Li; J. Zhou; M. Long, Characterization and cloning of oxygen-tolerant hydrogenase from *Klebsiella oxytoca* HP1, *Research in Microbiology*. 1-7, 2011.
167. J. Rodriguez; R. Kleerebezem; J.M. Lema; V. Loosdrecht, Modeling product formation in anaerobic mixed culture fermentations, *Biotechnol Bioeng*. 93(3), 592–606, 2006.
168. B. Wang; W. Wan; J. Wang, Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production, *International Journal Hydrogen Energy*. 33, 7013-7019, 2008.
169. J.L. Wang; W. Wan, The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models, *Sci China Ser B-Chem*. 51(11), 1110 - 7, 2008.
170. J. Wang; W. Wan, Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review, *International Journal Hydrogen Energy*. 34, 235 - 244, 2009.
171. Jones D. T., W.D.R., Acetone-butanol fermentation revisited, *Microbiol Rev*. 50, 484 - 524, 1986.
172. Gottschal G, M.J., The induction of acetone and butanol production in cultures of *Clostridium acetobutylicum* by elevated concentrations of acetate and butyrate., *FEMS Microbiol Lett*. 12, 385 - 9, 1981.
173. C.S. Stewart, Some effects of phosphate and volatile fatty acids salts on the growth of rumen bacteria, *J. Gen. Microbiol*. 89, 319–326, 1975.

174. R.J. Zoetemeye; A.J.C.M. Matthijse; A. Cohen; C. Boelhouwer, Product inhibition in the acid forming stage of the anaerobic digestion process, *Water Res.* 16, 633–639, 1982.
175. X. J. Zheng; H. Q. Yu, Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures, *Journal of Environmental Management.* 74, 65–70, 2005.
176. H.K. Chin; Z.S. Chen; C.P. Chou, Fedbatch Operation Using *Clostridium acetobutylicum* Suspension Culture as Biocatalyst for Enhancing Hydrogen Production, *Biotechnol. Prog.* 19, 383-388, 2003.
177. H.Q. Yu; Z.H. Hu; T.Q. Hong, Hydrogen production from rice winerywaste water by using a continuously-stirred reactor, *J Chem Eng Jpn.* 36(10), 1147–51, 2003.
178. F. Li; N.Q. Ren; C. P. Yang; J. Z. Li; X. Z. Wang; P. Li, The molecular characterization and traits of a high efficient biohydrogen-producing bacterium in *clostridium* genus, *Acta Energetica Solaris Sinica.* 27, 208-211, 2006.
179. Shiue-Lin Li; Liang-Ming Whanga; Yu-Chieh Chao; Yu-Hsuan Wang; Yung-Fu Wang; Chia-Jung Hsiao; I.-Cheng Tseng; Ming-Der Bai; Sheng-Shung Cheng, Effects of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenation performance and microbial ecology of bioreactors fed with glucose–peptone and starch–peptone, *International Journal Hydrogen Energy.* 35, 61-70, 2010.
180. Johns, A.T., The Mechanism of Propionic Acid Formation by *Clostridium propionicum*, *J. gen. Microbiol.* 6, 123-127, 1952.
181. R. D. Kuchta; R.H. Abeles, Lactate Reduction in *Clostridium propionicum*, *The Journal Of Biological Chemistry.* 260(24), 13181-13189, 1985.
182. C. Chu; Y. Ebie; Y. Inamori; H. Kong, Effect of hydraulic retention time on the hydrogen yield and population of *Clostridium* in hydrogen fermentation of glucose, *Journal of Environmental Sciences.* 21, 424–428, 2009.