



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN UN REACTOR
INTERMITENTE”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA

ANDRES GABAYET MUÑOZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: FELIPE ALBERTO KELLER TORRES

VOCAL: Profesor: JUAN JOSE RUIZ LOPEZ

SECRETARIO: Profesor: ALEJANDRA CASTRO GONZALEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: ABRAHAM RODRIGO FLORES RAMOS

2° SUPLENTE: Profesor: JOSE AGUSTIN GARCIA REYNOSO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: POSGRADO DE FACULTAD DE
INGENIERIA DE LA U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA: DRA. ALEJANDRA CASTRO GONZALEZ

SUSTENTANTE : ANDRES GABAYET MUÑOZ

AGRADECIMIENTOS:

**AGRADEZCO A LA U.N.A.M. FACULTA DE QUÍMICA, PROFESORES,
COMPAÑEROS Y AMIGOS.**

A MIS SINODALES:

DRA. ALEJANDRA CASTRO GONZALEZ

FELIPE ALBERTO KELLER TORRES

JUAN JOSE RUIZ LOPEZ

ABRAHAM RODRIGO FLORES RAMOS

JOSE AGUSTIN GARCIA REYNOSO

A EL POSGRADO DE LA FACULTAD DE INGENIERIA DE LA U.N.A.M.

**AL INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA.
A.C. IPICYT**

**AGRADEZCO EL APOYO DE LA BECA ECONÓMICA DE LA U.N.A.M. DEL
MACROPROYECTO “CIUDAD UNIVERSITARIA Y LA ENERGÍA”**

A MIS COMPAÑEROS EN EL LABORATORIO

DEDICATORIA

**A MIS PADRES AMADO GABAYET ORTEGA, ARACELI MUÑOZ MARTIN, A
MI ABUELA MARGARITA MARTIN REYNOSO Y A MI NOVIA Y AMIGA
GUADALUPE ISLAS BRIBIESCA POR SU APOYO INCONDICIONAL.**

Índice

Glosario.....	3
Resumen.....	5
Índice de Tablas.....	6
Índice de figuras.....	8
Capítulo 1.....	10
1.1 Introducción.....	10
1.2 Objetivo.....	12
Capítulo 2. Generalidades.....	13
2.1 Sistemas anaerobios.....	13
2.1.1 Primera etapa.....	13
2.1.2 Segunda etapa.....	14
2.1.3 Tercera etapa.....	16
2.2 Parámetros que influyen en la fermentación oscura.....	18
2.3 Parámetros generales de operación.....	20
2.4 Características Físicoquímicas determinantes.....	22
2.5 Inóculo.....	31
2.6 Características de los nutrientes.....	33
2.7 pH y TRH.....	36
2.8 Mezclado.....	42
2.9 Tipo de reactor.....	44
2.10 Métodos de conservación de biomasa bacteriana.....	45
2.11 Soportes bacterianos.....	46
2.12 La segunda etapa: Un proceso análogo para optimizar la producción.....	49

Capítulo 3. Metodología	54
3.1 Fermentador.....	54
3.2 Caracterización de la materia orgánica	57
3.3 Inoculación.....	57
3.4 Parámetros fisicoquímicos de control	59
3.4.1 Fase líquida.....	59
3.4.2 Fase gaseosa	60
3.5 Determinación experimental de los gases.....	60
Capítulo 4.....	61
4.1 Cinética.....	61
4.2 Modelos cinéticos.....	61
4.3 Modelos cinéticos para la producción de hidrógeno	73
Capítulo 5. Resultados	77
5.1 Obtención e interpretación de datos cinéticos en un reactor intermitente mezclado	77
5.1.1 Determinación de constantes cinéticas	79
5.1.2 Determinación del orden de reacción.....	81
5.1.3 Algoritmo para determinar las constantes cinéticas.....	83
5.1.3.1 Modelo de Monod	86
5.1.3.2 Modelo de Contois.....	88
5.1.3.3 Modelo de Chen y Hashimoto	90
5.1.3.4 Modelo de Grau.....	92
5.1.3.5 Modelo de Gompertz.....	93
5.2 Resultados experimentales.....	95
5.3 Análisis de Resultados	97
Conclusiones.....	102
Referencias.....	103

Glosario

AGV	Ácidos Grasos Volátiles
BEARM	Bio-Electroquímicamente Ayudado por un Reactor Microbiano
BSR	Bacterias Sulfato Reductoras
CMC	Celda Microbiana de Combustible
CSTR	Reactor Continuo en Estado Estacionario
DQO	Demanda Química de Oxígeno
Kc	Tiempo de fermentación
NADH	Dinucleotido Adenina de Nicotinamida
OHPA	Bacterias Acetogénicas Productoras Obligadas de Hidrógeno
RCO	Rango de Carga Orgánica
P	Valor Máximo de Producción de Hidrógeno
PTN	Presión y Temperaturas Normales
P/V	Peso sobre Volumen
RALLFA	Reactor Anaerobio de Lecho de Lodos de Flujo Ascendente
Rm	Valor máximo de Producción

SSE	Suma de errores al cuadrado
SSF	Sólidos Suspendidos Fijos
SST	Sólidos Suspendidos Totales
SSV	Sólidos Suspendidos Volátiles
ST	Sólidos Totales
STF	Sólidos Totales Fijos
SV	Sólidos Volátiles
TPA	Trifosfato de Adenosina
TRS	Tiempo de Retención de alimentos Sólidos
TRH	Tiempo de Residencia Hidráulico
Xmax	Concentración máxima de bacterias
Xo	Concentración inicial de bacterias
λ	Tiempo de Retraso de Fase

Resumen

Este proyecto surge de la necesidad de abordar el tema de energías renovables. El hidrógeno ha surgido como vector energético, pues es una de las más prometedoras formas de energía por ser limpia, reciclable y eficiente.

La producción biológica de hidrógeno por procesos de fermentación oscura ha atraído recientemente la atención como una alternativa de energía renovable. Por medio de un fermentador a nivel laboratorio se realizó un tratamiento de desechos orgánicos de Ciudad Universitaria, UNAM. La metodología en la operación de fermentación oscura se basó en un reactor CSTR el cual se alimentó con un inóculo de excremento de vaca para lograr la adaptación de las bacterias. Éste reactor operó a una temperatura entre 35°C y 40°C.

La inoculación del reactor se llevó a cabo mediante el calentamiento del excremento de vaca, aplicando una patente para su preparación, la agitación del reactor se cambió desde de 10 hasta 120 revoluciones por minuto y su pH se trabajó variando su valor desde 5 hasta 7. De los resultados de operación se realizaron las cinéticas químicas así como los modelos cinéticos de la producción de hidrógeno y consumo de sustrato.

Se probaron con 5 modelos; Grau, Monod, Contois, Hashimoto y Gompertz. Se encontró que el modelo de Contois junto con el modelo de Gompertz son los que más se ajustaron a los resultados obtenidos en el experimento.

Con éstos modelos se pudo verificar el coeficiente de rendimiento de las bacterias Y , con un valor s tan alto obteniendo un valor de 18.657. Por el otro lado el coeficiente de decaimiento de las bacterias (0.177238 por día), es un valor que al relacionarlo con el coeficiente de rendimiento, indica que la tasa de mortalidad es prácticamente insignificante.

Se espera que los resultados obtenidos de este estudio puedan proporcionar la información necesaria para la operación de procesos de fermentación oscura para la producción de hidrógeno.

Índice de Tablas

Capítulo 2

<i>Tabla 2.1 Uso de nutrimentos en la operación de fermentadores.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 2.2 Resultados comparativos sobre investigaciones variando pH, inóculo, sustrato, TRH, temperatura y producción de hidrógeno</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 2.3 Tipo de reactores utilizados en diferentes investigaciones para la producción de hidrógeno</i>	<i>48</i>

Capítulo 3

<i>Tabla 3.1 Dimensiones del fermentador utilizado en la presente investigación</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 3.2 Caracterización Físicoquímica del sustrato a utilizar para degradación a hidrógeno por el fermentador.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabla 3.3 Análisis de la fase líquida en el fermentador experimental.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabla 3.4 Análisis de la fase gas en el fermentador experimental</i>	<i>60</i>

Capítulo 4

<i>Tabla 4.1 Resultados constantes cinéticas de una investigación utilizando sacarosa como sustrato.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 4.2 Parámetros cinéticos utilizando la ecuación logística para una investigación que utiliza ácido acético en una fermentación oscura produciendo hidrógeno</i>	<i>73</i>
<i>Tabla 4.3 Parámetros cinéticos de la producción acumulada de hidrógeno utilizando la ecuación de Gompertz.....</i>	<i>73</i>

Capítulo 5

<i>Tabla 5.1 Concentrado de los resultados de los parámetros cinéticos calculados con el algoritmo empleado para el experimento.....</i>	<i>85</i>
<i>Tabla 5.2 Concentrado de los resultados de los parámetros cinéticos calculados utilizando el modelo de Monod.....</i>	<i>87</i>
<i>Tabla 5.3 Concentrado de los resultados de los parámetros cinéticos calculados utilizando el modelo de Contois.....</i>	<i>89</i>
<i>Tabla 5.4 Concentrado de los resultados de los parámetros cinéticos calculados utilizando el modelo Chen y Hashimoto.....</i>	<i>91</i>
<i>Tabla 5.5 Concentrado de los resultados de los parámetros cinéticos por el modelo Grau.....</i>	<i>93</i>
<i>Tabla 5.6 Concentrado de los resultados de los parámetros cinéticos por el modelo Gompertz.....</i>	<i>94</i>
<i>Tabla 5.7 Resultados de los modelos utilizados en el experimento a excepción del modelo de Gompertz.....</i>	<i>98</i>
<i>Tabla 5.8 Concentrado de los resultados de los parámetros cinéticos por el modelo Gompertz.....</i>	<i>98</i>
<i>Tabla 5.9 Comparación de los parámetros cinéticos encontrados con los modelos Grau, Monod, Contois y Chen y Hashimoto con respecto a otras investigaciones.....</i>	<i>100</i>
<i>Tabla 5.10 Comparación de los parámetros cinéticos encontrados con el modelo Gompertz con respecto a otras investigaciones.....</i>	<i>101</i>

Índice de figuras

Capítulo 3

<i>Figura 3.1 Diagrama esquemático del diseño del fermentador utilizado.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 3.2 Fermentador experimental</i>	<i>55</i>
<i>Figura 3.3 Arreglo de sistemas fermentadores de menor tamaño</i>	<i>56</i>

Capítulo 4

<i>Figura 4.1 Datos experimentales de una investigación antecedente sobre la concentración del sustrato y biomasa versus tiempo, utilizando el modelo Monod.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 4.2 Consumo de sustrato en el tiempo en un experimento utilizando un modelo de inhibición de sustrato.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 4.3 Concentración de biomasa en el tiempo, aplicando el modelo de inhibición del sustrato</i>	<i>68</i>
<i>Figura 4.4 Perfil de la concentración de biomasa en un experimento utilizando como sustrato ácido acético.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 4.5 Concentración de biomasa variando la concentración.....</i>	<i>71</i>

Capítulo 5

<i>Figura 5.1 Determinación del orden cero de reacción para los resultados experimentales</i>	<i>82</i>
<i>Figura 5.2 Determinación del orden 1, Ln (ST) frente al tiempo.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 5.3 Determinación del segundo orden de reacción para los resultados experimentales</i>	<i>83</i>
<i>Figura 5.4 Determinación gráfica de las constantes cinéticas según el algoritmo aplicado para el experimento</i>	<i>85</i>
<i>Figura 5.5 Determinación gráfica de las constantes cinéticas para el modelo Monod para el experimento.....</i>	<i>87</i>

<i>Figura 5.6 Determinación gráfica de las constantes cinéticas para el modelo Contois para el experimento.....</i>	<i>89</i>
<i>Figura 5.7 Determinación gráfica de las constantes cinéticas para el modelo Chen y Hashimoto para el experimento.....</i>	<i>91</i>
<i>Figura 5.8 Determinación gráfica de las constantes cinéticas para el modelo Grau para el experimento</i>	<i>93</i>
<i>Figura 5.9 Determinación gráfica de las constantes cinéticas para el modelo Gompertz para el experimento</i>	<i>94</i>
<i>Figura 5.10 Hidrógeno presente en los experimentos</i>	<i>96</i>
<i>Figura 5.11 Metano presente en los experimentos.....</i>	<i>96</i>
<i>Figura 5.12 Dióxido de carbono presente en los experimentos</i>	<i>97</i>

CAPÍTULO I

1.1 Introducción

La energía es una propiedad asociada a los sistemas materiales. Gracias a esta propiedad los cuerpos tienen capacidad para producir cambios en otros cuerpos o en ellos mismos. La capacidad para producir cambios se manifiesta de muchas formas ya que puede tener diferentes orígenes. Para tener esto en cuenta, se le asigna a la energía un apellido que informa con qué está asociado cada tipo de energía.

Por ejemplo existe la energía cinética asociada al movimiento de los cuerpos, la energía potencial gravitatoria relacionada con la posición de los cuerpos, la energía interna denominada así porque depende de la naturaleza, temperatura y masa de un cuerpo. Otro tipo de energía es la energía eléctrica la cual está asociada al movimiento de las cargas eléctricas.

Un hecho relevante respecto a la energía es su transformación. La energía asociada a un sistema definido puede aumentar o disminuir en él cuando se realiza un cambio.

Cuando se utiliza, por ejemplo, gasolina como combustible, se está utilizando una sustancia, el petróleo, el cual ha necesitado millones de años para crearse, por lo tanto se puede decir que es una fuente de energía no renovable. No ocurre lo mismo con la biomasa. Es una fuente energética renovable si el ritmo de utilización de ésta no sobrepasa el de la creación de la misma. En cuanto al impacto ambiental, la biomasa suele ser un combustible más limpio en azufre y metales que los combustibles fósiles, y no contribuye al llamado efecto invernadero. El hecho es que al quemar un combustible ya sea fósil o de biomasa se genera un gas, el dióxido de carbono CO_2 , que es el principal responsable del calentamiento global del planeta por efecto invernadero.

Todos los seres vivos están constituidos por unos pocos elementos químicos, principalmente carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. El carbono presente en el cuerpo procede de los alimentos que se toman como animales o vegetales y se puede decir que es un carbón procesado ya que las sustancias que se toman son compuestos complejos del carbono como los glúcidos, lípidos o las proteínas. En el caso de las plantas, el carbono presente en las mismas procede de la atmósfera pues lo toman del dióxido de carbono. Para procesar dicho dióxido de carbono y convertirlo en una sustancia compleja necesaria para los procesos vitales, la planta utiliza la fotosíntesis.

En definitiva, las plantas toman dióxido de carbono de la atmósfera para crecer y los seres humanos devuelven dicho dióxido de carbono a la atmósfera cuando se utilizan dichas plantas como combustible. El balance global es nulo y la biomasa como combustible no contribuye al aumento del dióxido de carbono en la atmósfera. No ocurre lo mismo con el petróleo o el carbón ya que han sido necesarios muchos millones de años para fijar el dióxido de carbono que generan en su combustión (Sims-Ralph, 2004).

La utilización de la biomasa como fuente energética mediante la combustión directa de la misma, tal como ocurre en una planta de aprovechamiento energético de biomasa. No es la única forma de uso de la biomasa como fuente de energía ya que, como ya se ha comentado, el concepto de biomasa es muy amplio. Así, también se utiliza la biomasa para la producción de biodiesel que sustituyen al gasoil o a la gasolina.

Otro uso diferente de la combustión directa de la biomasa, contemplado en este proyecto es la fermentación por bacterias. En el proceso de fermentación se produce un gas llamado biogás rico en metano y en nuestro caso bajo ciertas condiciones que se definirán más adelante, hidrógeno. Éste biogás es un combustible que se puede utilizar como tal. Para poder comprobar la rentabilidad de esta nueva forma de energía renovable es necesario analizar su comportamiento cinético con la ayuda de reactores intermitentes.

1.2 Objetivo

El objetivo principal que se pretende cumplir con esta tesis es determinar la cinética de la fermentación de la biomasa para la degradación del sustrato y de la producción de hidrógeno utilizando modelos convencionales y actuales.

CAPÍTULO II

GENERALIDADES

2.1 Sistemas anaerobios

Las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en el proceso anaerobio, son parecidas a las que se realizan en los árboles vivientes, en el tracto de animales, en manantiales termales y hasta en el intestino de los seres humanos, sólo que en forma controlada y a velocidades de reacción mayores.

Los organismos anaerobios liberan materia orgánica rica en energía, ya que la energía contenida en los enlaces de los compuestos orgánicos, quedan en su mayor parte, al final del proceso, en los enlaces de metano. Es decir los organismos anaerobios no utilizan completamente la energía potencial que reciben, utilizan el 10% de la energía de su sustrato para funciones de reproducción y el 90% restante se conserva como metano. Los organismos aerobios emplean de un 60% a un 65% de la energía del sustrato en la síntesis de nuevas células, y la fracción restante es utilizada para llevar a cabo otras funciones metabólicas disipadas en forma de calor (Wen-Hsing Chen, 2006).

2.1.1. Primera etapa

En esta etapa los polímeros naturales tales como la celulosa, la pectina, las proteínas o los compuestos de más bajo peso molecular como aminoácidos, sacáridos, lípidos o compuestos aromáticos son transformados por hidrólisis y fermentación de ácidos carboxílicos, alcoholes, hidrógeno y dióxido de carbono. Los ácidos carboxílicos producidos

son principalmente ácidos grasos volátiles (AGV's) como ácido acético, propiónico, butírico, valérico, por dar unos ejemplos (Wakayama, 2001).

Las bacterias responsables de esta etapa pertenecen a diferentes grupos y pueden ser anaerobias facultativas o estrictas. Entre ellas, las bacterias anaerobias celulolíticas han despertado un gran interés por su capacidad de hidrolizar la celulosa, actualmente se tiene un gran interés por las bacterias capaces de fermentar los compuestos aromáticos, tales como los procedentes de la lignina, los que se encuentran en los efluentes de la industria química como fenoles, ácido benzocarboxílico, ácido fenilacético o derivados de ácidos aminados.

En esta etapa si no se controla bien el reactor, puede ocurrir una desestabilización del proceso entero, en caso de una sobrecarga, la hidrólisis de la materia orgánica provoca una sobreproducción de ácidos que van a acidificar exageradamente el medio y bajar el pH hasta niveles inhibitorios; esto puede provocar una producción de hidrógeno que va a inhibir la metanogénesis (Horiuchi y col., 2002).

Las bacterias anaerobias estrictas del género *Clostridium* constituyen una fracción importante en la población anaerobia responsable de la primera etapa, pero se ha reportado también la presencia de otros tipos bacterianos tales como *Bacteroides*, *Bacillus*, *Enterobacterias*, *Pelobacter*, *Acetobacterium*, *Ilyobacter*, entre otras.

2.1.2. Segunda etapa

Las bacterias OHPA

Durante la acetogénesis, los productos de fermentación producidos anteriormente son convertidos en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono por un grupo de bacterias denominadas bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno u OHPA por sus

siglas en inglés. Estas bacterias son inhibidas por el hidrógeno que producen, y es necesario que éste no se acumule en el medio; por eso tienen una estrecha relación con las bacterias que remueven el hidrógeno, bacterias llamadas hidrogenofílicas y por lo general estas bacterias son metanogénicas, estas sustituyen a las metanogénicas, cuando el medio no tiene sulfatos. Ciertos grupos de bacterias sulfatoreductoras son capaces de establecer una relación sintrófica con las metanogénicas hidrogenofílicas, de la misma manera que las bacterias OHPA.

Esta relación sintrófica que se establece entre bacterias productoras de hidrógeno y bacterias hidrogenofílicas, y que procura una ventaja para los donadores de hidrógeno recibe el nombre de transferencia interespecie de hidrógeno (Majizat y col., 1997).

Una sobrecarga de un reactor o una inhibición de las bacterias hidrogenofílicas, puede conducir a una sobreproducción de hidrógeno cuya acumulación va a inhibir la digestión y llevar el reactor a fallar. Este fenómeno de transferencia interespecie tiene también su importancia a nivel de la primera etapa de la digestión. Numerosas bacterias fermentativas son capaces de transferir electrones vía el hidrógeno a bacterias hidrogenofílicas, lo que resulta, por parte de estas bacterias, en un incremento en acetato y por consecuencia en una ganancia energética. Sin esta transferencia de hidrógeno estarían en la obligación termodinámica de producir mayores cantidades de compuestos tales como etanol, lactato, propionato, butirato, etc. Lo que no es interesante para el sistema porque está diseñado para una producción máxima de acetato, principal precursor del metano en los reactores anaerobios (Okamoto y col., 2000).

Las bacterias homoacetogénicas

Este grupo es capaz de transformar una mezcla de hidrógeno, dióxido de carbono, y algunos sacáridos, tales como la glucosa y la fructosa, en acetato únicamente.

Nuevos géneros han sido descubiertos en esta última década, además de las bacterias homoacetogénicas pertenecientes al género *Clostridium*, tales como la bacteria *Acetobacterium Woodii* entre otras.

Las bacterias sulfato-reductoras o BSR

Estas bacterias se caracterizan por su capacidad de producir H_2S . La importancia de este grupo en los digestores depende principalmente de la presencia de sulfato en el efluente a tratar y también de la capacidad de las BSR, de establecer en ausencia de sulfato, una transferencia interespecie de hidrógeno con bacterias metanogénicas (Yokoi y col., 2002). Básicamente las BSR pueden ser divididas en dos grupos principales:

Las BSR del grupo I capaces de oxidar parcialmente el lactato dando acetato y dióxido de carbono, la mayoría puede también utilizar el etanol. Las más representativas son *Desulfovibrio Vulgaris* y *Desulfovibrio Desulfuricans*, estas dos bacterias pueden establecer una transferencia interespecies de hidrógeno con una metanogénica en ausencia de sulfatos.

Las BSR del grupo II realizan en presencia de sulfatos la oxidación de los ácidos grasos volátiles y de unos compuestos aromáticos. En ausencia de sulfatos, no pueden realizar una transferencia interespecie de hidrógeno, lo que deja a las OHPA la exclusividad de la degradación de los ácidos grasos volátiles cuando el efluente no tiene sulfatos.

2.1.3. Tercera etapa

Esta etapa es llevada a cabo por el grupo de bacterias metanogénicas, este grupo tiene características fisiológicas y metabólicas particulares. Tal como las bacterias de la etapa II, las metanogénicas son anaerobias estrictas y es necesario tener potenciales de oxido-

reducción inferiores a -330 mV, para que pueda iniciarse la metanogénesis. Existen especies mesofílicas y termofílicas.

Las particularidades bioquímicas de las bacterias metanogénicas, tales como la composición particular de su pared, las secuencias nucleotídicas, sus coenzimas y metabolismo, hicieron que fueran clasificadas en una nueva división *Mendosicutes* en la cual se encuentran las *Archaeobacterias*. A esta misma división pertenecen bacterias extremadamente termofílicas y halofílicas (Lin y col., 2003).

Las bacterias metanogénicas oxidan un número de bacterias como las metilaminas, acetato, etanol, propanol-2 y ciclo-pentanol. Básicamente, estas bacterias pueden dividirse en dos grandes grupos tróficos:

Las bacterias hidrogenofílicas no acetoclásticas: Obtienen su energía de la oxidación del hidrógeno en presencia de dióxido de carbono como aceptor de electrones, la mayoría de las bacterias de este grupo pueden utilizar el formato. Estas bacterias no pueden utilizar el acetato como fuente de energía pero unas lo utilizan como fuente de carbono. Los ejemplos más clásicos de estas bacterias y las más utilizadas en estudios bioquímicos y fisiológicos son:

-*Methanobacterium Formicicum*; (bacilos)

-*Methanospirillum Hungatei*; (largos filamentos)

-*Methanobrevibacter sp*; (bacilos cortos)

-*Methanobacterium Thermoautotrophicum*; (especie termofílica, bacilos largos)

Las bacterias metanogénicas acetoclásticas: Producen metano a partir del grupo metil del acetato según la ecuación [2-1]:



Esta reacción es de suma importancia para la degradación anaerobia, dado que el 73% del metano producido por los digestores viene del acetato (Woodward y col., 2000).

En este grupo de bacterias, algunas pueden utilizar el metanol, las metilaminas y el hidrógeno. Las metanogénicas pueden dividirse en dos géneros:

-Las bacterias del género *Methanosarcina*.

-Las bacterias del género *Methanosaeta*: Anteriormente este género era conocido bajo el nombre de *Methanotherix*.

2.2 Parámetros que influyen en la fermentación oscura

Uno de los principales parámetros que influyen en la degradación anaerobia es el desarrollo de su tecnología la cual ha dado lugar a tres generaciones de reactores.

En la primera generación comprenden aquellos procesos donde la biomasa se encuentra en suspensión. En la segunda generación los microorganismos son retenidos en el reactor, ya sea al suministrarles un soporte para que se adhieran en forma de biopelícula, o bien por medio de su sedimentación. Los reactores de tercera generación tienen también los microorganismos en forma de biopelícula, pero el soporte se expande o fluidiza con altas velocidades de flujo.

Dentro del grupo de reactores de segunda generación se encuentra el reactor de lecho de lodos, el cual es un proceso bien establecido para el tratamiento anaerobio de varios desechos líquidos. Este tipo de reactor que se ha difundido en varios países no requiere ningún tipo de soporte para retener la biomasa, lo que implica un ahorro importante. Su principio de funcionamiento se basa en la buena sedimentabilidad de la biomasa producida dentro del reactor, la cual se aglomera en forma de gránulos o pellets. Estos granos cuentan con una actividad metanogénica muy elevada. Este reactor es de flujo ascendente y en la parte superior cuenta con un sistema de separación gas-líquido-sólido, el cual evita la salida de sólidos suspendidos en el efluente y favorece la evacuación del gas y la

decantación de los flóculos que eventualmente llegan a la parte superior del reactor. Un punto importante en su diseño es la distribución de las entradas de agua residual, ya que una mala dispersión puede provocar que ciertas zonas de la cama de lodos no sean alimentadas, desperdiciando así su actividad (Chen y col., 2001).

La capacidad de decantación de estos lodos favorece un alto grado de retención de biomasa en el reactor, que cuenta con una buena actividad metanogénica y permite mayores tiempos de retención de los microorganismos.

Para arrancar un reactor RALLFA lo ideal es inocularlo con un volumen suficiente de inóculo, pero esto es facilitado cuando existen reactores RALLFA en operación que ya han acumulado suficientes lodos. Si no es necesario encontrar otras fuentes de inóculo.

Algunos parámetros marcan las ventajas de este sistema como la limitada producción de lodos de desecho con un ahorro considerable en el sistema de tratamiento de lodos, los bajos requerimientos de nutrimentos, la producción de energía en forma de metano y los requerimientos limitados de equipo, la versatilidad para aplicar altas tasas de carga y la longevidad de la actividad de los lodos anaerobios son algunas de las ventajas de este sistema. Sin embargo a estos parámetros óptimos se suman otros parámetros no tan favorables como son:

- La digestión es por lo regular sensible a los compuestos tales como CHCl_3 , CCl_4 , CH^- y metales pesados, así como cambios bruscos en su alimentación.
- La necesidad de periodos relativamente largos para el arranque del proceso, debido a las lentas tasas de crecimiento de las bacterias anaerobias.

Por otro lado, los inconvenientes son la necesidad en algunos casos de realizar un postratamiento, en el caso de descarga de un cuerpo receptor sensible y la mala imagen tradicional de la degradación anaerobia, han sido un obstáculo para su aplicación a nivel industrial.

Otra desventaja es que la calidad del agua de salida es mejor en el proceso aerobio, pero sus costos son mucho más elevados. De requerirlo el proceso anaerobio puede ser seguido de un pulimiento aerobio, pero ya alimentado con sólo el 5% de la carga original, reduciendo considerablemente sus costos; el conjunto tendría una eficiencia superior al 99% (Brosseau y col., 1982).

Una similitud para entender sencillamente los parámetros de una degradación anaerobia puede ser su similitud con el escremento de una vaca, el cual es muy parecido a un digestor anaerobio. En el escremento se tiene una entrada de alimento y una salida, que es mezclado por movimientos musculares, y produce metano, dióxido de carbono y un alto contenido de microorganismos. El tiempo de residencia en el escremento para los organismos en suspensión y las partículas pequeñas es de un día aproximadamente. Pero en realidad los dos sistemas tienen metas diferentes.

Los digestores están optimizados para una producción máxima de metano y mínima de ácidos, por el contrario el escremento es más óptimo para la producción de ácidos grasos volátiles que son absorbidos a través de la pared del escremento, y representan el 50% de la energía asimilable en los rumiantes. En el escremento se considera que la mayoría del metano producido proviene del hidrógeno. Por el contrario en los digestores es el acetato el mayor precursor del metano con 73% (Roychowdhury y col., 1988).

2.3 Parámetros generales de operación

Para desarrollar un sistema anaerobio y específicamente un proceso RALLFA, es necesario tener condiciones favorables en los reactores, así como grandes cantidades de inóculo. Varias fuentes de inóculo pueden ser utilizadas, tales como estiércol de vaca, lodos activados adaptados anaeróbicamente, lodos de fosas sépticas, lodos de otros reactores anaerobios, etc. Es necesario realizar estudios para poder evaluar las potencialidades de cada inóculo y obtener el menor tiempo de arranque en los reactores, siendo el arranque una etapa crítica para cualquier tipo de fermentador.

Varios factores son una fuerte influencia negativa sobre este arranque, entre ellos: Condiciones de remoción no adecuadas, capacidad insuficiente del lodo para alcalinizar el medio y evitar condiciones de acidificación extrema que también inhiben la metanogénesis provocando actividades microbianas bajas.

Por otro lado, el arranque también se ve afectado por el tipo de alimentación que tengan los reactores. En este estudio se prepara un mezclado de diferentes desechos de fruta y papa en general cada compuesto con su concentración en condiciones controladas y con desechos reales para el momento de arranque de un digestor poniendo como inóculo el excremento de vaca (Heyndrickx y col., 1987).

Otro parámetro muy importante a tomar en cuenta es el hecho de estudiar la cinética de un reactor de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA), alimentado por un inóculo.

El hecho de diferenciar un modelo cinético de los otros modelos permite de una manera más eficaz que los parámetros sean óptimos y mantengan un mayor control en la rentabilidad del biodigestor.

Los parámetros óptimos permiten una operación mucho más rentable al reactor inoculado.

Algunos de ellos son:

- Demanda química de oxígeno, DQO total, que representa la cantidad total de materia orgánica e inorgánica susceptible de ser oxidada por una sustancia oxidante fuerte.
- Sólidos suspendidos totales, SST que son toda la materia en suspensión incluyendo la biomasa, minerales y materia orgánica, (peso seco constante).
- Sólidos suspendidos volátiles SSV que representan la cantidad de biomasa contenida en SST, (la temperatura de obtención es de 500 °C).
- Sólidos suspendidos fijos (SSF) representan la cantidad de material inorgánico contenido en la muestra.

Así se define como:

$$SSV \text{ mg/L} = \frac{1000 (SST-SSF)}{\text{Volumen de muestra}(ml)}$$

- El pH y la alcalinidad a cierto pH en cada muestra.
- Medición de la producción de biogás por desplazamiento del líquido en las columnas, y su contenido de hidrógeno por cromatografía de gases así como el contenido de otros gases en cuestión.

En el sistema de vacío se utilizan los siguientes parámetros:

- SST, SSV y SSF.
- El pH, es muy importante para asegurar un control y evitar que nuestra producción de hidrogeno disminuya. De igual forma se controla la alcalinidad del reactor.

2.4 Características Fisicoquímicas determinantes

Durante los procesos de reacción biológicos, los AGV's pueden acumularse en un alto nivel y así pueden estimular, inhibir o aún peor volverse tóxicos para la bacteria fermentativa, dependiendo de su concentración. Se asume que tanto las formas inducidas como las disociadas de estos ácidos pueden actuar como agentes que impiden el crecimiento de microorganismos. Por otra parte, la inhibición de la producción de metano gracias al propionato y el acetato se realiza de igual forma bajo la influencia del pH, sugiriendo que la inhibición se realizó debido a los ácidos libres y no tanto por los ácidos aniónicos. Además, la fuerza iónica en la solución aumentaría si existe un nivel alto de AGV's disociados en el medio de cultivo, lo que causaría una ruptura de las células que a su vez causaría efectos inhibitorios en los microorganismos (Lee y col., 2004a).

En la producción del hidrógeno proveniente de los desechos orgánicos, el acetato, el propionato y el butirato son por lo general los principales productos de la degradación (Chen y col., 2005).

Sin embargo, existe poca información disponible en la literatura en cuanto a los efectos inhibitorios de los AGV's en la producción de hidrógeno con diversos microorganismos mesofílicos. Estudios recientes demuestran que el hidrógeno debe ser producido a partir de recursos renovables para que su empleo pueda contribuir a tener un impacto favorable en los niveles de CO_2 globales. La generación sostenible de hidrógeno puede ser alcanzada gracias a una gama de tecnologías, incluyendo procesos biológicos. Algunos procesos biológicos utilizan algas y bacterias dentro de bioreactores en contacto con la luz, o bacterias en crecimiento fermentativo con un proceso de digestión (Liu y col., 2004).

Sustratos sustentables para la producción fermentativa de hidrógeno incluyen sustratos ricos en carbohidratos y desechos industriales de alimentos (Lee y col., 2004b).

El CO_2 producido por el metabolismo de estas fuentes de biomasa renovables viene del carbón neutro, y todo esto es parte del ciclo natural del carbón. Desde que los procesos de fermentación para la producción de hidrógeno son a partir de una alimentación estéril, se han estudiado posibilidades para usar una mezcla de microflora derivada de fuentes naturales, a menudo enriquecida en especies *Clostridium* productoras de hidrógeno (Khanal y col., 2004).

Muchos estudios de laboratorio han usado procesos tipo batch, particularmente para investigar exigencias nutritivas y obtener hidrógeno de diferentes cultivos puros. Los cultivos puros de *Clostridium* se han usado en procesos a escala industrial por muchos años con el propósito de producir acetona de solventes, butanol y etanol (Veziroglu y col., 2001).

El estudio de las condiciones óptimas con procesos tipo batch para producir solventes es relevante, ya que el inverso de estas condiciones son las óptimas para los procesos continuos de producción de H_2 (Chang, 2002). Sin embargo, éstos procesos tipo batch implican un tiempo de inactividad regular y condiciones no fijas, de ahí que los procesos

continuos son potencialmente más atractivos. Ha habido algunas controversias para optimizar procesos continuos (Wu y col., 2006) pero también ha habido un progreso considerable de estas investigaciones en los últimos años, aunque un proceso económica y técnicamente factible aún no ha sido establecido.

Tanto la producción de hidrógeno por medio de la fermentación mesofílica como la termofílica continúan en investigación. La fermentación termofílica puede ser en particular apropiada para el tratamiento de la alimentación que contiene patógenos o sistemas acoplados a un proceso de tratamiento para el aprovechamiento de calor asociado. De otra manera, debido a la energía necesaria, el proceso termofílico es la opción técnica y económicamente favorable.

Los sustratos estudiados para la producción fermentativa de hidrógeno han sido en su mayoría ricos en carbohidratos, aunque la producción de hidrógeno con proteínas también ha sido reportada (Zhang y col., 2003). La producción máxima de hidrógeno reportada con una fermentación de carbohidratos es de 4 mol/molH₂, con el ácido acético como el producto final de fermentación.

En el campo de la práctica los resultados no son tan buenos, algunos carbohidratos son convertidos en células bacterianas, y también aparecen otros productos finales diferentes del ácido acético, por ejemplo el ácido butírico. Para favorecer la producción de hidrógeno y suprimir la actividad metanogénica es necesario una mezcla adecuada de microflora. Esto incluyendo un método de precalentamiento para tratar el inóculo y seleccionar la formación de la espora *Clostridium*, optimizando condiciones de funcionamiento como el tiempo de retención hidráulico TRH, el pH, la concentración del sustrato y la reducción de la presión parcial (Fang y col., 2006).

Se requiere de una etapa después del proceso de producción de hidrógeno para convertir los productos finales de fermentación en otras formas de energía. Actualmente la mayor alternativa para esta segunda etapa es la degradación anaerobia para formar el biogás.

En el progreso que se han llevado a cabo procesos continuos que utilizan la mezcla de microflora mesofílica, se destacan dudas en el conocimiento que afectan las aplicaciones prácticas.

Así como las tecnologías maduras de lodo activado y la degradación anaerobia que fueron utilizadas para el tratamiento de aguas residuales, el mismo método puede ser llevado a cabo para la producción de hidrógeno. Usando la mezcla de microflora y estudiando la biología molecular sobre las comunidades microbianas responsables, es de mayor interés el hecho de que muchos microorganismos son capaces de producir el hidrógeno a partir de hidratos de carbono dando lugar principalmente a la especie *Clostridium* (Lay y col., 2000). Un estudio reciente analizó la presencia de especies microbianas en un cultivo productor de hidrógeno, con un reactor continuo estacionario, un pH de 5.5, 36 °C, 6.6 h de TRH, con residuos de lodo como inóculo, agregando glucosa (Liu y col., 2004).

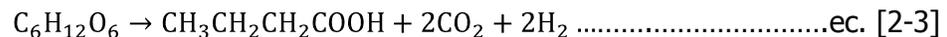
Se encontró que el 64.4% de las bacterias producidas eran *Clostridiaceae*, y el 43.8% estaban más cerca de ser bacterias de tipo *Clostridium cellulosi*, el 12.5% eran de tipo *Clostridium acetobutylicum* y el 8.3% de tipo *Clostridium tyrobutyricum*. El 18.8% de todas las reproducciones fue considerado como del tipo *Enterobacteriaceae*, y el 3.1% como *Streptococcus bovis*. En un estudio de lodo granular, con condiciones como 26°C, pH de 5.5, 6 h de TRH y sacarosa como sustrato se demostró que el 69% de la producción de bacterias están asociadas con cuatro especies de *Clostridium* y el 13.5% con *Sporolactobacillus racemicus* del grupo de los Bacilo-*Estafilococos* (Kapdan y col., 2006).

Las bacterias *Clostridium* son versátiles y pueden utilizar un rango amplio de sustratos que contienen hidratos de carbono incluyendo el almidón, la celulosa y la hemi-celulosa (Taguchi y col., 1995). Así, a diferencia de la producción de bioetanol, se utilizan sustratos más complejos que pueden ser usados para la producción de hidrógeno sin el pre-tratamiento. Sin embargo, la flexibilidad metabólica de la bacteria *Clostridium* fomenta la producción de una gama de productos finales que pueden bajar la producción de H_2 desde el máximo teórico de 4 mol/mol alcanzadas, cuando el acetato es el producto final de fermentación como lo muestra la ecuación [2-2].



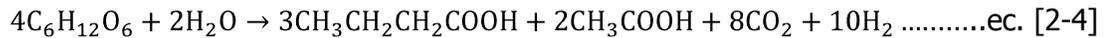
La producción de hidrógeno por *Clostridium* es la principal característica de las enzimas de hidrogenasa. Los electrones de transferencia del *Ferredoxin* reducido o del NADH a protones regeneran formas oxidadas (Fd_{ox} y NAD^+) éstas requieren así mismo la glucólisis y la oxidación descarboxilada del *piruvato* para generar TPA. El efecto de la presión parcial del hidrógeno sobre estas reacciones (Kidby y col., 1991).

Si la presión parcial de hidrógeno es suficientemente baja, el NADH puede ser oxidado vía hidrogenasa, produciendo H_2 hasta la máxima producción teórica de 4 mol H_2 /mol de hexosa consumida y una máxima producción de TPA. Sin embargo, en condiciones normales en el reactor, la mayor parte del NADH será oxidado en reacciones produciendo productos finales de fermentación reducidos, como el butirato (Yang y col., 2006) con una producción inferior molar de hidrógeno [ec.2-3] y un TPA menos importante:



Continuamente muchos experimentos con microflora muestran que el acetato y el butirato son los productos finales, con una cantidad de butirato superior a la del acetato (Wang y col., 2003b). Algunos investigadores encontraron durante la operación de un reactor CSTR utilizando sacarosa, con 10-60 gDQO/L, con un pH de 5.5 y 12 h de TRH que el cociente entre el butirato y el acetato (B/A) eran directamente proporcional a las moles de H_2 producidas con respecto a las moles de hexosa consumidas (Yu y col., 2002). Así el cociente B/A proporcionalmente podría ser un indicador cuantitativo del metabolismo del sustrato y de la producción de H_2 .

Las proporciones B/A son una base de balance que convertido a una base molar están entre 0.64 y 3.69. Como un ejemplo de estequiometría conocida existe la ec. [2-4] (Kim y col., 2006):



De esta forma, por cada 2.5 moles de H₂ producido se tiene 1mol de hexosa fermentado. Sin embargo, Taguchi y col. (2003) predicen una producción molar alrededor de 0.85; con aproximadamente el 11% de sacarosa convertida a la biomasa microbiana y del 7.4%-10.6% a etanol, una cantidad grande de hexosa debe haber sido convertida en otros productos metabólicos para explicar esta discrepancia.

La proporción B/A de 1.2 (correspondiente a una proporción en una base molar de 0.6 y una base del cociente del balance de 1.5) (Kokua y col., 2006) en un reactor CSTR que maneja una glucosa de 7 g/L (pH de 5.5, 6 h de TRH) dio 2.1 moles de H₂, como lo predicho por Kim y col (2001).

Este trabajo experimental es necesario para clarificar la naturaleza y la utilidad del cociente B/A como una proporción de la producción molar de hidrógeno.

Aunque la producción de etanol, como producto final reducido de la hexosa, consume NADH, se ha demostrado que una fermentación que produzca etanol y acetato a partir de carbohidratos en una proporción molar cerca de 1 es favorable para la producción de hidrógeno (Bridgwater, 2006).

El reactor, con un lodo floculante y un pH de 4.5 podría operar en la melaza con una alta cantidad de RCO, y dar 5.6 m³H₂/m³d con un RCO de 68.2 kgDQO/m³d . Aunque no se haya obtenido un mol de H₂ por un mol de hexosa fermentado, la estequiometría de la reacción de la ec.[2-5] indica que se tienen 2 mol de H₂ por 1 mol de hexosa fermentado:



El lactato y el propionato pueden ser producidos de igual forma por la bacteria *Clostridium* o por otra bacteria que compite en la biodiversidad de la microflora, disminuyendo la producción de hidrógeno. *Clostridium* como *C. acetium* puede bajar la producción de H₂ para convertir el H₂ y el CO₂ en acetato o puede convertir la hexosa directamente al acetato solamente por el proceso de homoacetogénesis (ec. [2-6] y ec. [2-7], (Hirano A. y col., 1998)):



El aumento en la producción de acetato no significa necesariamente un aumento en la producción de H₂ (Rocha y col., 2001). Durante la experimentación sobre un sustrato de almidón en específico (pH de 5.2, 30°C, 18 h de TRH, con un inóculo precalentado), (Hallenbeck y col., 2002) se observó que la concentración de acetato se duplicaba la cual no está vinculada con el aumento en la producción de H₂.

Cuando se burbujea con N₂ para bajar el H₂ y la presión parcial del CO₂, se inhibe el aumento en el acetato. La influencia de la homoacetogénesis sobre el H₂ y sus condiciones podrían suprimir o favorecer la producción de H₂, esta investigación merece un estudio más profundo.

Las reacciones del metabolismo pueden bajar la producción molar de hidrógeno en presencia de productos finales de fermentación. Estos últimos pueden ser el resultado de un cambio en el metabolismo dentro de la microflora o un cambio en la abundancia de acetogénicos o lactato-etanol en la producción de propionato. Duangmanee y col. (2002) y Van Ginkel y col. (2001) parecen ser los primeros en estudiar los cambios bacterianos

demográficamente en diferentes condiciones en un reactor de producción de H₂. Lin y col. (1999) estudiaron un reactor tipo CSTR con un pH de 5.5 en presencia de glucosa.

En 10 h de TRH sólo la bacteria *Clostridiaceae* fue descubierta mientras que con 30 h de TRH las poblaciones eran más diversas (incluyendo *Bacillaceae* y *Enterobacteriaceae*). Con 10 h de TRH y una temperatura que oscila entre 30 y 37°C se observó un cambio demográfico de poblaciones relacionadas con *Clostridium acidisoli* a *C. acetobutlicum*. Ueno y col. (1995) siguieron el trayecto de las comunidades en un reactor CSTR operando con melaza a un pH bajo con la bacteria acidofílica proveniente de aguas residuales. Ahí establecieron una comunidad acetato-etanol productora de hidrógeno después de 28 días.

La cantidad de producción de hidrógeno se elevó con el aumento de bacterias *Etanogénicas sp.*, *Acidovorax sp.*, *Kluyvera sp.* y *Bacteroides* las cuales eran las poblaciones dominantes. Apareció que la producción de hidrógeno dependió no sólo de su propia producción pero también sobre el metabolismo de la comunidad entera.

Okamoto y col. (2000) utilizaron un reactor CSTR con 20 g/L de sacarosa de DQO con un TRH entre 2 y 12 h mostrando la presencia de *Clostridium ramosum* relacionado con especies presentes. Sin embargo las bacterias *Clostridium pasteurinum* se relacionan solamente con especies que pueden estar presentes entre 12, 8 y 4 h de TRH. Una transición en la estructura de la comunidad fue observada con una disminución en el TRH a 0.5 h en un reactor granular mezclado la cual mostró una especie dominante con una alta semejanza a una *C. pasteurianum* asociada con un nivel de producción específico de hidrógeno reportado por Yokoi y col. (2002) como la producción máxima de hidrógeno.

Wang y col. (2003a) al estudiar un reactor CSTR operando durante 12 h de TRH con diferentes concentraciones de sacarosa encontró un predominio de especies *Clostridium*. Una de ellas con 10 gDQO/L de sacarosa fue relacionada con un acetógeno, y otra con 60 gDQO/L de sacarosa fue relacionada con la espora que forma el ácido productor *Bacillus racemilacticus*.

Estas especies tienen un efecto limitativo sobre la producción de hidrógeno y es interesante que predominen en diferentes concentraciones de sustrato. Gracias a un análisis genético se puede mejorar la tecnología de producción del H_2 , si las especies identificadas se caracterizan por condiciones de funcionamiento óptimas que pueden ser implementados en la práctica para mejorar la producción de hidrógeno.

Tomando como modelo las técnicas moleculares desarrolladas, la información sobre la abundancia de las especies y los indicadores proteínicos que muestran los cambios del metabolismo con condiciones de funcionamiento, estos podrían generar estudios útiles para su optimización.

Otro parámetro importante es el coeficiente de producción para la generación de biomasa microbiana en reactores que producen hidrógeno para consideraciones fundamentales. Esto está relacionado con la suma de la energía que hizo disponible como TPA por unidad de sustrato fermentado, que depende de los productos finales de fermentación y de ahí de las condiciones de funcionamiento del reactor.

El grado de conversión del sustrato a la biomasa influye tanto en la cantidad de sustrato disponible para la producción de hidrógeno como en la cantidad de biomasa generada para la disposición o para el paso a una segunda etapa como digestor.

Li y col. (2003) experimentalmente investigaron la relación entre la sacarosa de la biomasa consumida y la microbiana producida, medida como sólidos suspendidos volátiles (SSV) en un CSTR con un pH de 5.4.

Una producción de lodo de 0.21 gSSV/g de glucosa fue determinada por un reactor CSTR a un pH de 5.5, 36°C, 6 h de TRH, consumieron el 27% del efluente. Una producción de lodo media de 0.20 gSSV/g de sacarosa fue determinada para un lodo granular operando a un pH de 5.5, 26°C, entre 5 y 28 h de TRH y una constante de RCO de 25 g/Ld (un efluente de sacarosa de 5-30 g/L) y un coeficiente de producción de 0.1 gSSV/gDQO fue dada por Owen y col. (1999) con un reactor granular que funciona con 20 gDQO/L

sacarosa y entre 4 h y 24 h de TRH. Lay (2001) encontró una producción importante del coeficiente de producción de gránulos de H_2 , la cual funciona agregando sacarosa con un pH de 4.4 y 0.334 gSSV/gDQO.

Puede ser visto que en este rango el trabajo experimental debería ser realizado para proporcionar el coeficiente de producción con una variedad en las condiciones de funcionamiento y productos finales de fermentación, que proporcionará los datos para modelar e identificar las condiciones que reducen al mínimo el exceso de la producción de biomasa microbiana para una operación práctica.

2.5 Inóculo

Una gama de fuentes naturales ha sido usada para proporcionar el inóculo óptimo en la producción de H_2 dada la diversidad en la microflora, incluyendo el lodo de aguas residuales, suelos, composta de estiércol de ganado y el sedimento de los ríos. El inóculo comúnmente es pretratado para seleccionar la espora de formación y destruir la metanogénesis.

Lui (1996) investigó a ciertas condiciones (el pH de 3 a 4 con HCl cada 24 h) utilizaron desperdicios para activar el lodo de una planta de tratamiento de aguas residuales. Este inóculo ha sido usado para desarrollar el reactor de lecho de lodo granular. En un papel posterior, Horiuchi y col. (2002) obtuvieron un enriquecimiento del ácido, y una producción del lodo de inóculo sin actividad metanogénica después de la incubación de los desperdicios de comida. Se activó el lodo proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales municipal que trabaja con 1 M de NaOH cada 24 h.

Sin embargo, el enriquecimiento de formación de esporas por el tratamiento térmico es más común, aunque haya variación en la temperatura lograda y el tiempo durante el cual es aplicado. Este tratamiento térmico del inóculo a una escala industrial sería técnicamente más difícil que el tratamiento de álcali o el del ácido, es por lo tanto

importante investigar posteriormente si existe una posibilidad para mejorar. Oh y col. (2002) realizaron un tratamiento térmico usado a escala piloto, arrancando reactores tipo batch de 50 L con desperdicios de alimentos cada 8 días.

El tratamiento térmico puede prevenir el desarrollo de esporas productoras de propionato las cuales generan hexosa. Sin embargo, Lee y col. (2001) no usaron ninguna clase de calentamiento en el lodo del inóculo para obtener la producción de H₂ a partir de la sacarosa. Otros investigadores obtuvieron producción de H₂ sin usar ningún otro tipo de calor para tratar el lodo incluyendo a Liu y col. (2003) aunque ellos requirieron un período de adaptación.

Por el contrario Van Groenestijn y col. (2002) encontraron que sin tratar el inóculo del lodo anaerobio del digestor con calor, el funcionamiento de un CSTR con características como un pH de 5.5 y 10 h de TRH no era suficiente para prevenir la metanogénesis por más de una semana. Es así como determinaron que era necesario establecer la técnica de precalentamiento del inóculo, a reserva de que a escala industrial sea rentable. El tratamiento térmico del inóculo no sólo reduce la presencia de esporas de formación de los microorganismos pero también activa las esporas *Clostridium* para comenzar la germinación. Las esporas de *Clostridium* usadas para la producción industrial de solventes son rutinariamente activadas por un choque de calor. El calor motiva el receptor responsable de la germinación de modo que sea más sensible a la presencia de germinantes.

Usando un inóculo pretratado, la germinación permite que las esporas puedan desarrollarse en una fase de tipo batch y así evitar que el inóculo pierda sus propiedades. Comúnmente la cabeza superior del reactor es llenado con un gas inerte, pero se desconoce si esto es necesario, ya que la germinación de esporas *Clostridium* es generalmente menos susceptible a la inhibición con oxígeno (Kumar y col., 2000b). La germinación es inducida por los aminoácidos, azúcares, ribositos, enzimas y la presión hidrostática, pero a menudo existe una especie específica necesaria que es la combinación

de germinantes por ejemplo alamina y lactato para las esporas *Clostridium botulinum*. Si se conocen los germinantes, el arranque puede llegar a agilizarse con mayor éxito.

La información de posibles nuevos arranques en diferentes períodos sin presencia de comida es de igual forma necesaria. No se tiene aún claro si es posible detener la producción de H_2 y comenzarla de nuevo después de un período proporcionando condiciones que favorezcan la germinación, o si es necesario volver a inocular.

La exposición al oxígeno provoca esporulación en las culturas de algunas especies por ejemplo *Clostridium beijerinckii*. Las *Clostridium C7* son más tolerantes a las concentraciones de oxígeno (Chen y col., 2001). Mientras la falta de carbón en la *C.celluloliticum* produjo esporulación sobre la cellobiosis.

La acumulación de los ácidos acéticos y butíricos en los productos finales de fermentación puede provocar que el proceso de *Clostridium* cambie a la producción de solvente y esporulación. Sin embargo, se carece de información exacta sobre las condiciones adversas que causan la esporulación.

2.6 Características de los nutrimentos

Entre los requerimientos de los nutrientes, así como N y P, que son sustancias nutritivas necesarias para la producción eficiente de hidrógeno también se incluye el S y el Fe, componentes de igual forma significativos en la producción de hidrógeno. Para la mayoría de los estudios de laboratorio con sustratos puros, la sustancia nutritiva estaba por lo visto en exceso para asegurar la limitación del carbón, aunque pocos artículos en realidad declaren esto.

El medio de sales simples escogido por Blanch y col. (1997), como se decía, garantizaba el exceso de todas las sustancias nutritivas esenciales otras que la glucosa y así permitían el crecimiento limitado de glucosa de la bacteria. La mayor parte del trabajo de laboratorio

para medir la optimización de nutrientes ha usado cultivos de tipo batch. Más información es necesaria en cantidades mínimas de sustancia nutritiva para la operación continua.

Aunque algunas *Clostridium* tengan fijadores para nitrógeno, estudios de laboratorio con hidratos de carbono definidos usaron una fuente de nitrógeno, y muchas producciones reportaron 1 mol de H₂ por 1 mol de hexosa con la adición de sustancias minerales nutritivas solamente. Kumar y col. (2000a) reportaron la producción de hidrógeno a partir del azúcar o del almidón con la adición solamente de N y sales P, la mayor parte de los estudios han usado soluciones con sales minerales más complejas. Producciones razonables de hidrógeno fueron obtenidas a pesar de la amplia variedad de sustancias nutritivas añadidas.

Además de una fuente de N y P, sólo el K, Mg y Fe es común a todos los experimentos. Existe una variación en la cantidad de Fe añadido en lo que concierne a la concentración de hexosa, algunos investigadores no añadieron uno o varios de los elementos Ni, Ca, B, Mo, Zn, Co, Cu, Mn o Iodo. Van Niel y col. (2003) excepcionalmente no añadieron una fuente de S al medio. La concentración actual de todos los elementos en el reactor para un medio definido contiene de igual forma concentraciones de agua e impurezas de los reactivos usados.

La información sobre las verdaderas concentraciones es aún menos cierta usando sustratos de cosechas o desechos de alimentos. Como la tecnología es aplicada a una gama mayor de sustratos, los estudios de exigencia nutritiva se harán más necesarios para la optimización del proceso y remontarán a la rentabilidad. Las cantidades mínimas de N, P, S, Fe y minerales necesarios para la producción eficiente de H₂ en reactores continuos en varias condiciones, por ejemplo el pH y las concentraciones de sustrato, se deben determinar.

La Tabla a continuación representa diferentes condiciones de operación utilizadas por algunos investigadores.

Tabla 2.1 Uso de nutrimentos en la operación de fermentadores (Van Niel y col., 2003).

Elemento (mg/L)	Blanch y col., 1997	Chen y col., 2001	Kumar y col., 2000 ^a	Van Groenestijn y col., 2002	Liu y col., 2003	Lee y col., 2001
N	131	929	680	351	680	72.9
K	112	56	113	97	183.7	53
S	42	5.5	0.6	12.8	9.9	----
Mg	32	13	32	3.6	37.8	12.0
Ni	12	----	0.13	----	12.05	1.23
Ca	14	----	----	0.20	18.0	18.02
B	0.4	----	0.07	----	1.36	0.69
Mo	0.01	----	0.20	----	7.61	8.66
Zn	11	----	0.24	0.40	11.04	2.4
Co	6.2	0.04	0.74	----	3.72	1.24
Cu	3.7	1.3	----	----	3.73	1.42
Mn	8.3	----	0.69	----	6.95	1.39
I	----	----	1.91	----	----	----
Fe	17.2	5.03	1.0	2.9	17.3	11.0
P	102.3	22.0	44.5	76.2	101.5	21.03
Hexosa	7000	20000	10000	10000	7765	5330
DQO:N	57:1	23:1	16:1	30:1	11.4:1	73:1
DQO:P	73:1	970:1	240:1	140:1	77:1	253:1

2.7 pH y TRH

Otros parámetros muy importantes son el pH y el TRH. Varios investigadores han usado un pH bajo, un tiempo de retención corto con un CSTR o una combinación de ambos para evitar la metanogénesis.

Oh y col. (2003) observaron el desarrollo de la producción de metano en un CSTR que operaba con un cultivo mixto mesofílico cuando el pH aumentaba a 6.0, aún con un TRH corto de 6 h. Sin embargo, los descubrimientos de otros investigadores con pH mayores a 6.0, contradicen esto.

Fabiano y col. (2002), con un inóculo pretratado con ácido, operó un reactor de lecho fijo donde las bacterias deliberadamente fueron conservadas a un pH de 6.7 y se encontró metano no perceptible. Es posible que una población metanogénica no hubiera podido ser desarrollada en el tiempo en el cual operaron los reactores (16 d).

kaushik (2005) manejó un CSTR con 20 g/L sacarosa durante más de 350 días y un pH de 6.8 entre 2 y 12 h de TRH sin detectar ninguna traza de metano, dando una producción máxima molar de hidrógeno de $1.75 \text{ molH}_2 / \text{mol}$ de hexosa.

Nath y col. (2005) trataron el inóculo y los residuos de cervecería en un CSTR durante un período de 10 meses y no detectaron el metano aún en las condiciones de pH de 6.5 y 18 h de TRH. Koku y col. (2003) reportaron un excelente desempeño con un reactor de lecho de lodo granular y a condiciones de pH de 6.7 usando sacarosa, como también lo realizó Lay y col. (1997) con un pH de 6.6.

La experiencia en el laboratorio hasta ahora sugiere que no puede haber ningún problema con el desarrollo de la población de metanogénicos, aún en reactores de biomasa. Sin embargo, se requiere de mayor experiencia con verdaderas aguas residuales que puedan contener metanogénicos.

Los ejemplos anteriores sugieren una producción aceptable de hidrógeno que puede ser obtenida con un pH alrededor de 6.5 a 6.8. Sin embargo, usando un cultivo con glucosa, Kumar y col. (2001) reportaron una fuerte producción de ácido láctico con un pH mayor a 6 y se aumentó la producción de acetato.

Wang y col. (2004) reportaron un metabolismo dominante en un ambiente mesofílico de CSTR, inoculado con un lodo anaerobio en un digestor operando con glucosa. El metabolismo cambia lentamente de butirato a acetato y propionato cuando el pH fue aumentando a 8 o más, esto es atribuido a un cambio en la población microbiana.

El inicio de producción de propionato también fue observado por Oh y col. (2004) cuando el pH fue aumentando a 7.0 en un CSTR con glucosa (6 h de TRH, a 36°C) y la conversión también disminuyó con un pH de 5.5. Se puede concluir que el metabolismo de butirato-acetato en la producción de H_2 es más competitivo con un pH menor o igual a 6 que con un pH neutro.

Una gama de pH se ha probado en condiciones continuas, los puntos de investigaciones se han realizado hacia un grado óptimo para la producción de hidrógeno con un rango de pH de 5.2 a 5.8 sobre una variedad de TRH (de 6 a 32 h) y tipos de sustrato (sacarosa, almidón y desechos de industria de cerveza) (Tabla 2.2). Donde es posible calcular el número de moles en la producción de H_2 , donde sustratos puros de hidrocarburos son usados, la producción máxima de la Tabla 2.2 está en el rango de 2.15-1.7 mol H_2 /mol hexosa consumida.

Sin embargo, hay algunas pruebas que demuestran una aceptable producción de hidrógeno y una fuerte producción de etanol con un pH aún más inferior. Kim y col., (2001) utilizaron 8 g/L sacarosa y un reactor tipo batch, concluyeron que bajando el pH de 5.2 a 4.8, el funcionamiento mejora.

En una revisión de su trabajo, Lee y col. (2002) dieron las condiciones de funcionamiento óptimas para la fermentación de acetato que produce hidrógeno a partir de la melaza con un pH de 4.0 a 4.5, un TRH de 4 a 6 h.

Rao (2001) hizo una investigación donde obtuvo una producción de hidrógeno con etanol y acetato a un pH alrededor de 4.5 y un reactor CSTR con un cultivo mixto a 30°C, mientras que ningún gas fue producido con un pH de 4.9. Él afirma que la fermentación del ácido propiónico es dominante cuando el pH se extiende de 5 a 6.

Nath (2004) también encontró que el pH de 5.5 y de 4.5 podría producir más hidrógeno sin la acumulación del ácido propiónico. Una producción de H_2 de 26 mol/kgDQO removido fue obtenido de la melaza con un pH entre 4.5 y 5 y una proporción de acetato-etanol en una base molar de aproximadamente de 1. Con un pH del efluente entre 4.3 y 4.5, Hawkes (2002) trabajó con un reactor de lecho granular y sacarosa como sustrato (4.7 g/L, 18 h de TRH) obteniendo una producción de 1.44 mol H_2 /mol hexosa. El butirato y el etanol eran los productos finales dominantes.

Se puede finalmente afirmar que los reactores pueden funcionar con pH's alrededor de 4.5, aunque con una baja ligera en la producción de H_2 que aquellos con pH's entre 5.2 y 5.7. Algunas ventajas consisten en que, como afirmó Das (2001), con un pH menor a 5 la homoacetogénesis tiene pocas probabilidades de que ocurra y aquella operación con el pH más bajo reduciría exigencias de álcali. Penya-Roja (2002) encontró que existen requerimientos de NaOH para una alimentación acidogénica con 10 g/L en un reactor CSTR. La glucosa aumenta de un 50% cuando el pH va de 4.5 a 5.0 y por más del 100% cuando el pH aumenta de 4.5 a 5.7.

Tabla 2.2 Resultados comparativos sobre investigaciones variando pH, inóculo, sustrato, TRH, temperatura y producción de hidrógeno (Penya-Roja, 2002).

Intervalo de pH	pH óptimo	Inóculo	Sustrato	TRH (ha)	Temp.(°C)	Máxima producción (molH ₂ /mol hexosa)
4.0-6.0	5.2	Pre-tratamiento del lodo anaerobio	Almidón	17	37	2.15
4.0-7.0	5.5	Lodo produciendo H ₂	Glucosa	6	36	2.1
5.7 y 6.4	5.7	Lodo anaerobio de aguas residuales	Glucosa	6	35	1.7
5.0-6.5	5.5	composta de estiércol de vaca	Residuos de la ind. Cervecera	18	37	43 mL H ₂ /gDQO
5.0-6.5	5.8	Pre-tratamiento de la composta de hierba	Levadura de cerveza	32	40	NA
4.5-6.0	5.5	Pre-tratamiento	Glucosa	10	30	2.5

Sin embargo, la proporción de ácidos no disociados como el acético y el butírico aumenta conforme caiga el pH en el orden de los pKa's de 4.78 y 4.81, respectivamente. Los compuestos no disociados pueden pasar a través de la membrana celular y la célula se convertirá en compuestos solubles, formará esporas o morirá. Con el pH menor a 5 se observó que la producción de hidrógeno cambia a la producción de compuestos solubles con un cultivo mixto y un almidón soluble.

El cambio de la producción de compuestos solubles al final del proceso tipo batch puede ser un mecanismo de la célula para desintoxicarse de los ácidos como productos finales no disociados. Pavlostathis (2001) repasó los efectos de la concentración de los ácidos no disociados sobre el cambio de producción de H_2 a compuestos solubles y concluyó que el valor del umbral no puede ser proyectado debido a la amplia gama reportada. De esta forma se constata la importancia de establecer la concentración de sustrato óptimo y el mínimo valor de pH para obtener un equilibrio entre el costo mínimo de álcali y una concentración apropiada del ion en el efluente y una producción máxima de H_2 .

Los TRH de corto tiempo en reactores CSTR pueden arrastrar a las bacterias metanogénicas y reducir el tamaño del reactor y el costo de inversión. En reactores CSTR funcionando con sacarosa, los tiempos de retención óptimos son de 8.0, 8.7, 12 y 13.7 h la cual ha sido reportada para producciones máximas de hidrógeno con una inhibición de la metanogénesis. Para la celulosa, Ribes (2003) hizo una investigación de la producción continua de hidrógeno en un cultivo mixto con un TRH bastante largo de 3 días con almidón soluble (a un pH de 6.4), sin encontrar ningún problema con la metanogénesis. El análisis estadístico, de estos experimentos indicó un grado óptimo de TRH entre 12.7 y 20.2 h, con 17 h de TRH con producciones máximas de hidrógeno.

Kovarova (2002) reportó que con almidón de trigo se reducía el TRH de 18 a 12 h mejorando la producción de H_2 sin afectar la remoción de almidón. En las 12 h de TRH, la producción de propionato disminuyó, sugiriendo remover las bacterias no-Clostridium. Para los desechos de cerveza Brouwer (2002) analizó 16 h (ó 4 d) de experimentos con un CSTR para determinar el pH y los TRH's óptimos para una producción eficiente de H_2 . El obtuvo $0.019 \text{ mol}H_2/\text{gSSV}$ que debe ocurrir a un pH de 5.8 y un TRH de 32 h. Fletcher y col. (2004) evaluaron 5 TRH's y 3 pH's en un CSTR a 37°C utilizando desechos de cervecería. Se demostró que la mayor producción de H_2 ocurría con 18 h de TRH, un pH de 5.5 y un RCO de 70 gDQO/Ld . Para una operación con reactores CSTR operando con sustratos complejos, almidón y desechos de levadura de una cervecería, se tienen que obtener TRH más largos que con la glucosa.

Las concentraciones de sustrato usadas en la producción H_2 con microflora mixta en reactores CSTR hasta hace poco han sido comúnmente alrededor de 10 g/L de carbohidratos. Sustratos de mayor concentración deberían permitir operar con mayor eficiencia pero la inhibición del producto probablemente pone el límite superior. Con concentraciones de glucosa entre 2.5 y 10 gDQO/L y TRH del orden de 1 a 10 h, aumentando el RCO y disminuyendo la producción de H_2 de 2.8 a 1.7 mol H_2 /mol glucosa con 30°C y un pH de 5.5.

Este efecto sobre todo fue relacionado con el aumento de la concentración de glucosa que con los cambios de TRH fue atribuido a la inhibición de H_2 . Sin embargo, Cech, (2003), investigó el efecto en un rango de concentraciones de sacarosa de 10 a 60 gDQO/L, con un CSTR, un pH de 5.4 y 12 h de TRH, encontró que la producción de hidrógeno en concentraciones de hexosa debajo de los 20 gDQO/L disminuía.

Arriba de 35 gDQO/L, se presenta una sobrecarga, con una molaridad del H_2 de 1.22 mol H_2 /mol hexosa y una concentración de sacarosa en el influente de 30 gDQO/L. Una disminución en la eficiencia en términos de molaridad de H_2 de 40 g/L fue reportada por Coleman (2001) que comparando la operación de un CSTR a 10, 20, 30 y 40 g/L de glucosa con 2.5 y 10 h de TRH.

Fletcher, (2004) examinó la operación continua con un pH de 5.2, 12 h de TRH y de 10-50 g/L de sacarosa. La operación estable fue obtenida con concentraciones de efluentes de sacarosa hasta 40 g/L sacarosa dentro de 5 días desde el inicio. Con 50 g/L el sistema fue menos estable, sin embargo el burbujeo del N_2 mejora su estabilidad. La producción H_2 disminuyó de 1.7 ± 0.2 mol H_2 /mol hexosa con 10 g/L de sacarosa de 0.8 ± 0.1 mol H_2 /mol hexosa a 50 g/L. Así el límite superior de la concentración del sustrato para la sacarosa o la glucosa sin una disminución marcada en la producción molar de hidrógeno puede estar alrededor de 30 g/L.

El nivel de ácido no disociado del acético y el butírico (en función del pH y el nivel del sustrato) así como la concentración de H_2 coloca el límite superior de la concentración del

sustrato. Giraldo-Gómez y col. (2002) reportaron que añadiendo ácido butírico en un reactor estable para levantar el nivel libre de ácido butírico de 33 a 63 mM paraba la producción de gas completamente, aunque el reactor se recuperaba 84 h después del pico. De manera similar la inhibición de la producción completa de H_2 fue observada por Spanjers (2002) añadiendo ácidos acéticos y ácidos butíricos con un pH de 5.0 para dar un ácido no disociado con concentraciones en el reactor de 50 mL/L y 63 mL/L de reactor, respectivamente.

La inhibición en la producción del biogás por el amoníaco, que también está relacionado con el pH, puede ser un factor en la fermentación de los desechos de los animales. Tros (2003) demostró que aumentando la concentración de amoníaco creciente de 0.8 a 7.8 g/L dio una caída progresiva en la molaridad del H_2 de 1.9 a 1.1 mol/mol hexosa en un CSTR operando con glucosa, un pH de 5.5 y 10 h de TRH.

2.8 Mezclado

Debería notarse que la alimentación que entra al reactor no debe estar pre-fermentada ya que esto bajaría la producción de hidrógeno. Para operaciones comerciales, será necesario para el stock de alimentación que sea entregado en un estado fresco al reactor, a diferencia de la tecnología anaerobia de los digestores. Existe una necesidad de los sustratos a nivel industrial para ser investigados en una operación continua para determinar la relación entre concentración de sustrato, pH, niveles de RCO y niveles de producción de H_2 . En vista de la naturaleza de muchos sustratos, esto probablemente requiere una investigación a escala piloto.

Otro parámetro muy importante es el hidrógeno y la presión parcial del CO_2 . En un ambiente natural o en una sola etapa anaerobia, la bacteria hidrogenotrófica como los metanógenos mantienen la presión parcial del hidrógeno en niveles bajos. En un reactor de hidrógeno acidogénico los niveles de CO_2 pueden bajarse artificialmente. Mezclando, por burbujeo del gas y realizando la extracción a través de membranas se puede afectar la producción de H_2 . En experimentos de operación continua con un cultivo sobrecalentado

y un aumento en la velocidad con la ayuda de un mezclador magnético dobla la tasa de producción del hidrógeno. En general, una agitación constante claramente ayuda a la producción de hidrógeno. Más información acerca de la Físicoquímica sobre el efecto de la agitación sería útil para el diseño de un reactor.

El burbujeo con N_2 en una proporción de 15 veces con respecto al nivel de producción de hidrógeno en experimentos con cultivos mixtos con glucosa (a 35°C , pH de 6 y 8.5 h de TRH) aumenta su producción de hidrógeno de 0.85 a 1.43 mol H_2 /mol glucosa. Weijma (2000) demostró que para la operación de un CSTR con 10 g/L de sacarosa, burbujeando con N_2 aumenta la producción de H_2 de 1.0 ± 0.1 a 1.7 ± 0.2 mol H_2 /mol hexosa. Werker (2000) en experimentos similares ampliaron la gama de concentración y reportaron que el burbujeo con N_2 mejoró la producción de H_2 por lo menos en un 35% con 40 g/L de sacarosa y 33% con 50 g/L, y también mejoró la estabilidad de su operación. Con partículas de almidón, Ribes (2003) encontró que el burbujeo con N_2 sirvió para reducir la parte de no gas de 50% hasta un 7% aumentando la producción de H_2 de 1.3 a 1.9 mol H_2 /mol hexosa convertida.

Así se ha comprobado que el burbujeo realmente mejora la producción de H_2 , y puede mejorar la estabilidad del proceso, pero una evaluación total del proceso debe hacerse para determinar si la dilución de la corriente de gas H_2 es aceptable. Un rango de membranas para la separación de componentes de gas está disponible en el comercio y es común usarla para purificar el hidrógeno y el empleo en celdas de combustible. Debabrata (2001) ha usado un sistema de dos membranas poliviniltrimetilsilánicas para separar los componentes de las impurezas del gas del 90% para el hidrógeno y del 99% para el dióxido de carbono. Otras investigaciones son necesarias para desarrollar sistemas de purificación de gas más económicos para escalas apropiadas que liberen H_2 con los datos específicos requeridos.

El burbujeo continuo del reactor para bajar la presión parcial de H_2 puede usar otros gases de proceso como el metano o el CO_2 de la degradación anaerobia o bien recircular el gas después de que el hidrógeno haya sido removido. Stoll (2000), usó biogás de una segunda etapa de digestión, retiró el CO_2 y el H_2S y burbujeó el hidrógeno producido del

primer reactor con el gas resultante rico en metano, Esto produjo un aumento del 88% de la producción de hidrógeno.

Pruebas de un estudio tipo batch aconsejaron reducir el contenido de CO_2 para poder reducir la acetogénesis y aumentar la producción de H_2 . Sin embargo, resultados recientes con un CSTR que maneja sobre 20 gDQO/L sacarosa (con un pH de 5.3 y 12 h de TRH), la comparación del burbujeo con CO_2 frente al burbujeo con N_2 , mostró que el burbujeo con CO_2 era más eficaz. Contrariamente a expectativas, el análisis microbiano indicó que los acetógenos y las bacterias del ácido láctico fueron inhibidas por la presión parcial del CO_2 y procuraron la conversión del sustrato a la biomasa microbiana. Estos resultados podrían ser útiles en situaciones industriales si ellos pueden ser extrapolados a otros sustratos.

Es posible que la comparación de los resultados de Soler (2006) y Kapdan y col. (2006) muestran las diferencias que pueden existir entre la experimentación en el tipo batch y la experimentación en condiciones continuas.

2.9 El tipo de reactor

Los reactores tipo CSTR son los que se usan con mayor regularidad para la producción continua fermentativa de H_2 . Sin embargo, una gama de otros tipos de reactor existe, basada en aquellos disponibles para la digestión metanogénica. Gran parte de los reactores son usados en la producción de metano para conservar las grandes cantidades de catalizador, lleno de bacterias, en el reactor como flóculos, películas, gránulos o por membranas, disminuyendo los tiempos de TRH, con cargas hidráulicas más grandes, sin el fracaso de crecimiento lento de metanógenos. En reactores de producción de H_2 , con retención de bacterias, el mismo reactor proporciona el poder catalítico el cual permite un mayor RCO y una producción de H_2 volumétrico. La dificultad puede ser el crecimiento lento de metanógenos y la producción de propionato que son de igual forma retenidos y que disminuyen la producción de H_2 .

El proceso tipo batch con la operación de un reactor tipo CSTR puede ser proporcionado por el manual de alimentación a escala de laboratorio. Taguchi y col. (1995) utilizaron

desechos de una cervecería demostrando que un CSTR puede operar con 8 h de TRH y recargarse al 25% de su volumen, pero simulando una alimentación tipo batch, de este modo dio una variabilidad en la producción de H_2 . Kidby y col. (1991) usaron reactores tipo batch de diaria alimentación diaria para examinar la producción de H_2 de desperdicios de alimentos. A 35°C, 5 días de TRH, pH de 5.5, RCO de 3 a 8 gSV/Ld, el metano se formó, bajando la producción de H_2 . Yang y col. (2006) alimentaron con una mezcla sólida de desechos de casa (7.5% de los SV) dos veces al día a un reactor que produjo hidrógeno en 2 días de TRH, 37°C, pH de 5.2 y una eficaz inhibición de la metanogénesis.

Reactores de secuencia tipo batch en los cuales los microorganismos son conservados por un período determinado dentro del reactor, el cual también funciona sobre un sistema de alimentación tipo batch "S", optimizando el período de reacción "R". Wang y col. (2003a) con un reactor tipo batch secuencial (a 35°C, un pH de 6.7, un RCO de 82 g sacarosa/L reactor d, un cociente R/S de 5.6 a presión y temperatura estándar) obtuvieron por un rango de 1.3 mol H_2 /mol hexosa comparado con 1.15 mol H_2 /mol hexosa con un CSTR similar al RCO. La producción volumétrica y la producción específica de H_2 en un reactor secuencial tipo batch son similares con los valores reportados de un reactor CSTR, siempre y cuando los valores de los SSV sean más altos.

Amao (2006) utilizó el mismo sistema secuencial tipo batch obteniendo altas alcalinidades (mayores a 6 g/L de $CaCO_3$), debido a la operación con un pH de 6.7. Esto puede dar problemas de consumo de alcalinidad en el proceso global. Gaffron (1999) usó un reactor secuencial tipo batch operado con sacarosa con una parte de efluente que retorna al reactor después del tratamiento térmico. El sugiere un reactor secuencial tipo batch operando de forma rápida, para así favorecer la germinación de espores y también purgar los ácidos inhibitorios no ionizados.

2.10 Métodos de conservación de biomasa bacteriana

Es esencial conocer la capacidad de los microorganismos para formar flóculos conservados en un recipiente y con un proceso a base de lodo aerobio activado. La formación de H_2 en

cultivos mixtos que también formaron flóculos en los cultivos de procesos continuos, en un reactor a 23°C, pH de 5.5 y 4.5 h TRH se examinó por Gaffron (1998). A partir de que, los flóculos de tamaño pequeño aumentan con el RCO, adoptan propiedades razonables siguiendo la ley de Stokes. La baja temperatura usada puede haber favorecido la formación de flóculos.

Los métodos de conservación de biomasa bacteriana en los reactores incluyen un periodo de inmovilización. El lodo de aguas residuales después del pretratamiento con ácido se inmovilizó con gel y se usó en 24 experimentos de alimentación tipo batch con 20 g/L de sacarosa. Se obtuvo una producción específica de H_2 con 0.24 g/L de SSV por hora, elevando el valor de 6.081 gSSV/Lh con un uso repetitivo.

Sin embargo, la estabilidad y la durabilidad del sistema de inmovilización es más crítica que la producción. El lodo inmovilizado de silicona fue usado como inóculo en un reactor con agitación y puede haber proporcionado un depósito de bacterias durante la operación con una alta carga hidráulica.

2.11 soportes bacterianos

La biopelícula se utiliza sobre apoyos sólidos lo cual es muy común en los digestores. Melis (2004) usó polivinilo de alcohol como medio de soporte bacteriano sólido (sin precalentamiento del lodo de aguas residuales, con un pH de 5.0, 20 h de TRH, 20 g/L glucosa) la variable encontrada en la producción de H_2 en un experimento de 30 días, con aproximadamente 4 g/L de biomasa conservada en un reactor. La Biopelícula junto con el lodo de aguas residuales y el ácido se desarrollaron en carbón activado y sacarosa (17.8 g/L) alimentando los reactores en un intervalo de 0.5 a 5 h de TRH, 35°C y pH de 6.7 obteniendo de esta forma una producción volumétrica máxima de 7.41 g H_2 /L/h en 0.5 h de TRH y 1.321 g H_2 /L reactor en 1 hora de TRH (Tabla 2.3). En concentraciones de sustrato más altas la concentración disminuyó debido a la competencia con los otros gases presentes, sin embargo el tratamiento térmico restauró los niveles de producción de H_2 , sugiriendo que la formación de las esporas fueron debido a la biopelícula. El carbón

activado hasta ahora ha dado mejores resultados que el alcohol de polivinilo como medio de soporte bacteriano.

La retención de las bacterias en el reactor con una membrana se ha desarrollado para el tratamiento de aguas negras aerobio y anaerobio. Veziroglu y col. (2001) acoplaron una membrana de flujo a un CSTR (con 10 g/L glucosa, un pH de 5.5 y una temperatura de 26°C). Con unos tiempos de TRH's de 3.3 y 5 h y un TRS de 3.3 a 48 h, sin obtener metano en el biogás. A las 3.3 h de TRH se utilizó una membrana para dar 12 h de TRS incrementando los sólidos suspendidos totales (SST) de 2.2 a 5.8 g/L y el nivel de producción volumétrico de 0.30 a 0.37 L H_2 /Lreactor hora, asumiendo el 58.5% del H_2 en el biogás. A las 5 h de TRH se utilizó la membrana para dar un TRS de 48 h incrementando SST de 2.4 a 8.8 g/L pero el nivel de producción volumétrico de H_2 disminuyó.

El taponamiento y el alto costo de mantenimiento son desventajas de las membranas en los bio-reactores por lo tanto, no es una opción de tecnología viable. Liu (2002) experimentó hasta el día 39 a partir del pretratamiento del lodo de aguas residuales y desarrolló gránulos visibles después de 120 días, además de producir 20 g H_2 /L de sacarosa de 4 a 24 h de TRH, con un pH de 6.7, 7.2 gSSV/L en 24 h de TRH y 3.6 g/L en 4 h de TRH. La productividad de H_2 era casi constante entre 8 y 20 h de TRH, con un nivel de producción volumétrico de H_2 y una producción específica de H_2 que alcanza su punto máximo en 8 h de TRH (RCO de 60 g/Ld, Tabla 2.3). El tiempo de retención celular fue de 22.2 h. Los experimentos realizados con un pH de 6.7 dieron lugar a un alto grado de alcalinidad.

El período de arranque de este tipo de reactor RALLFA es largo y debe ser tomado en cuenta que hasta el octavo mes éste llega a una operación estable.

Tabla 2.3 Tipo de reactores utilizados en diferentes investigaciones para la producción de hidrógeno (Liu, 2002).

Tipo de reactor	Sustancia	RCO (gDQO/Ld)	gSSV/L	Prod. Volum. (Lbiogas/Lreactord)	Prod. específica de H ₂ (gSSV/Lreactorh)	Prod. de H ₂ (mL/Lreactor)
CSTR	Residuos de procesos indust. de cerveza	ND	2.3	0.045	0.019	ND
CSTR	Residuos de cerveza	70	ND	0.129	ND	ND
CSTR	Sacarosa	80	5.7	0.5	0.088	1.15
CSTR	Glucosa	80	4.59	0.8	0.093	2.06
Secuencia Batch	Sacarosa	82	4.4-7.5	0.42	0.065	0.94
Lixiviación	Residuos de comida	11.9(SV)	ND	0.15	ND	ND
Lodo inmovilizado	Sacarosa	NA	1(inicio)	ND	0.24-6.08	ND
Biopelícula (carbón activado)	Sacarosa	854	2.2	0.146	0.066	0.4
CSTR	Glucosa	72	5.8 (SST)	0.187	0.032	----
CSTR+ membranas	----	49	20	0.54	0.029	2.2
Gránulos	Sacarosa	60	5.0	0.28	0.056	0.86
Gránulos	Sacarosa	427	15	2.7	0.173	1.2
AC Gránulos sembrados	Sacarosa	854	26	7.3	0.28	1.2
Lodos	Sacarosa	1708	35.4	15.09	0.421	1.59

*ND=NO DETECTADO

En un experimento de 90 días, Chang (2002), usó gránulos después de haberlos cultivado en carbón activado, encontrándose el más corto periodo de TRH con 17.8 g/L de sacarosa dando una operación exitosa de 1 h con 35°C. Adicionando 5.4 mgCa²⁺/L se incrementó la retención de los gránulos a una concentración de biomasa de 15.5 gSSV/L. En 1 día de TRH con una conversión del 89% de sacarosa y un nivel de 1.2 molH₂/mol de hexosa convertido, el RCO de 427 g/Ld y los niveles de producción de H₂ mostrados en la Tabla 2.3 son más altos que para la mayor parte de los reactores.

Lin (2001) demostró que el carbón activado esférico era el de mayor poder de inducción para la formación de lodo granular, generando gránulos de 100 h desde el comienzo; alcanzando diámetros de 3 a 5 mm. La operación de 0.5 h de TRH (RCO de 854 g/Ld) por una corta temporada dio un alto nivel de producción volumétrico de H₂ del orden de 7.31 LH₂/h (Tabla 2.3).

Lo (2006) mejoró este nivel de sacarosa del 98% con una conversión de 9.31 LH₂/h en un reactor de cama de lodo inducido con portadores granulares de diámetro 8 y con agitación continua. El nivel de producción volumétrico de hidrogeno más alto al alcance del conocimiento alguna vez relatado es de 15.09 LH₂/h con una conversión de sacarosa del 93%, y un RCO de 1708 gsacarosa/Ld, en un reactor con una agitación constante y un lodo granular inmovilizado gracias a un lodo a base de silicona. Si estas tasas pudieran mantenerse, un acercamiento granular de la conversión de azúcares solubles simples es muy prometedora.

2.12 La segunda etapa: Un proceso análogo para optimizar la producción

En la segunda etapa del proceso es necesario, continuar con la etapa de fermentación oscura, producir más hidrógeno, metano o electricidad. Así el reactor de fermentación de hidrógeno se vuelve parte del proceso, análogo a una etapa de tratamiento de aguas residuales, y el proceso global debe optimizarse para la producción de energía y el impacto ambiental. Tres posibilidades para esta segunda etapa fueron presentadas a continuación.

En la fotofermentación, Sung (2004) mostró por primera vez que la fotofermentación de una mezcla de microflora enriquecida con un depósito podría ser usada para convertir el acetato y el butirato en H_2 . Si se tiene la tecnología y es costeable la aplicación de los fotobioreactores, el proceso de fermentación sin luz y con luz para la producción de H_2 a dos etapas que use una mezcla de bacterias sería un método prometedor. Además de que esto tiene una molaridad teórica máxima de producción de H_2 del orden de 12 mol/mol hexosa convertidas en un proceso de dos etapas.

Otra posibilidad son las celdas microbianas de combustible (CMC) las cuales pueden utilizar el acetato y el butirato para producir electricidad. Zhang (2006) demostró que los productos finales en la fermentación para la producción de hidrógeno en un sistema tipo batch de un cereal que procesa aguas negras altas en azúcar podrían ser usados con una CMC para producir electricidad con el 95% de DQO removido. La tecnología de las CMC esta investigándose y en desarrollo.

Una opción recientemente reportada para mejorar el proceso de recuperación del bio-hidrógeno es el reactor bio-electroquímicamente ayudado por un reactor microbiano (BEARM, por sus siglas en inglés) el cual funciona con una conversión de voltaje baja de acetato y H_2 . Esta puede ser una opción atractiva para la segunda etapa. La investigación es necesaria para evaluar el potencial para la generación de energía y el tratamiento de aguas negras evaluando el cociente entre la fermentación sin presencia de luz y la tecnología CMC.

Finalmente la digestión de dos etapas es un proceso relacionado con la producción fermentativa de H_2 que incluso ya está disponible a nivel comercial. En esta última, la primera etapa es usada para la etapa acidogénica y después se utiliza una etapa metanogénica. Esto mejora la estabilidad, así como la eficiencia del proceso, sin embargo se necesita más experiencia en el proceso para una variedad de desechos. La etapa acidogénica no se optimiza para la producción de hidrógeno.

Sin embargo, Lin (2006) utilizó 15 g glucosa/L encontrando que recirculando una menor cantidad de H_2 proveniente de la primera etapa, se obtiene una mayor producción de H_2 el cual consume a su vez los metanógenos y propionatos, etanol y la producción de butanol. No está claro todavía cuál de los componentes del efluente recirculado (por ejemplo ácidos volátiles, CO_2 , metanógenos) tenga este efecto sobre la producción de hidrógeno.

Al contrario, en el proceso de BIOCELL trataron el agua de proceso de la segunda etapa metanogénica de un RALLFA, la cual fue reciclada al reactor que produce H_2 sin ningún problema en la primera etapa de metanogénesis. El efluente sobrante de H_2 producido tiene un grado alto de alcalinidad (2,158 mgCaCO₃/L). Puede ser que los gránulos metanogénicos del RALLFA usados por Li (2004) permitieran un menor consumo de H_2 o una menor producción bacteriana productora de propionato para ser reciclada en la primera etapa por el lodo que cubre el digestor. También posiblemente con sustratos de biomasa complejos hay menos necesidad de adicionar alquenos que con la glucosa. Estudios posteriores de las dos etapas del proceso son necesarios, incluyendo aquellos con desechos de alimentos y llanocelulósicos, optimizando la operación tanto en la producción de H_2 como para en la adición de alquenos.

El proceso BIOCELL de dos etapas consiste en dos partes principales; tres reactores de lecho de lixiviación para acidogénesis y un reactor de lecho de lodo anaerobio (RALLFA) para la metanogénesis. Los 3 reactores de lecho fueron manejados en rotación con un intervalo de dos días entre cada etapa de degradación. La fermentación continuó durante 6 días con un tratamiento de deshidratación-aireación en el reactor. El reactor RALLFA convirtió los AGV y el alcohol de los reactores de lecho en metano.

Zhang (2006) operó un proceso a escala de laboratorio durante 110 días. Los reactores de lecho de lixiviación se operaron en modo secuencial sin el control del pH con recirculación del efluente RALLFA y una proporción de agua ligeramente fría para mantener el NH_3 y el Na^+ por abajo de los niveles inhibitorios. A 35°C y un RCO de 11.9 kgSV/m³.d, fue

removido un total de 72.5% de SV y convertido a H_2 (28.2%) y 69.9% a CH_4 en 8 días. Los valores de producción que se obtuvieron fueron 0.31 LH_2/gSV y 0.21 LCH_4/gSV , con niveles de producción volumétricos de 0.15 LH_2 y 0.711 LCH_4 por cada litro de reactor y por hora. Cada reactor de lecho de lixiviación fue manejado durante 6 días y el residuo sólido purgado se aireó durante 45 h siguiendo ciertas regulaciones coreanas encontradas para el empleo de compostas.

En otros estudios con un reactor RALLFA se trató el efluente generado durante la producción de H_2 con desperdicios de comida con 96% de DQO y hasta con un RCO de 12.9 gDQO/Ld. En el proceso de BIOCELL manejado durante más de 120 días a escala piloto, se utilizaron 50 reactores de cama de lixiviación seguidos de un reactor RALLFA de 219 L y se obtuvieron resultados similares. El 70.9% de SV reducido con un RCO de 12.5 $KgSV/m^3d$ en un tiempo de retención de alimentos sólidos de 8 días fueron obtenidos con el 18.7% de DQO añadido convertido a H_2 y el 52% al metano.

La producción de H_2 en un estudio de un reactor de dos etapas tipo batch con una mezcla de desperdicios de un restaurante se comparó con la producción de reactores de 35 y 55°C (ambos con pH de 5.5 y 5 días de TRH) y con reactores metanogénicos mesofílicos (cada 20 días de TRH) con un RCO de 8 g/Ld el proceso de un reactor termofílico cedió 8.9% de DQO de H_2 y el 66% de metano, mientras el proceso mesofílico del reactor dio producciones de H_2 más pobres. Lin (2006) usó 7.5% de SV de la mezcla de basura sólida alimentada manualmente dos veces al día con un RCO de 37.5 $kgSV/m^3/d$ en un reactor de hidrógeno que funciona con 2 días de TRH y un pH de 5.2. La producción de hidrógeno era de 43 cm^3/gSV añadido 250 cm^3/gSV removido. La segunda etapa metanogénica del reactor generó 21% más de metano que el otro reactor, aunque el TRH fuera de 17 días frente a 15 días.

Pocos detalles están disponibles sobre el proceso de dos etapas desarrollado por Cervecerías Sapporo Ltd. en colaboración con la Corp. Shimadzu e Hiroshima de la Universidad de Hiroshima la cual satisfactoriamente produjo H_2 y CH_4 a partir de desechos

de pan durante más de 6 meses. Esta tecnología produjo más del 10% de biogás comparado con el método existente de producción de metano solamente. Aproximadamente el 80% de los desperdicios de pan fueron convertidos en un cuarto del tiempo del tratamiento convencional.

El instituto de investigación de tecnología de energía de ciencia avanzada industrial y tecnología "The energy technology research institute of advanced industrial science and technology", De Japon, tiene una planta de hidrógeno/metano a escala piloto que funciona con agua caliente que contiene desperdicios de las cocinas como alimentos y papel. El tiempo de tratamiento total se redujo de 25 a 15 días, la descomposición de los desperdicios orgánicos aumentó del 60%-65% al 80% y la recuperación de energía aumentó de 40% a 46% hasta del 55% en comparación con la fermentación de metano convencional.

Procesos de dos etapas actualmente aparecen ser esenciales, y esto por lo tanto promete que hay buenas indicaciones para los procesos de dos etapas con una acidificación en la primera etapa y una segunda etapa metanogénica que da lugar a un tratamiento más eficiente y la recuperación de energía en un proceso metanogénico de una sola etapa. Es probable que la industria de alimentos y desechos de cocina pueda ser al principio más atractiva como fuentes de sustratos. La experiencia con estos sustratos complejos probablemente se desarrolla como un aumento de gastos de combustible y una mitigación en el cambio del clima, lo cual se hace más apremiante. El costo del reactor y los gastos de operaciones probablemente son similares a aquellos ya conocidos para la degradación anaerobia.

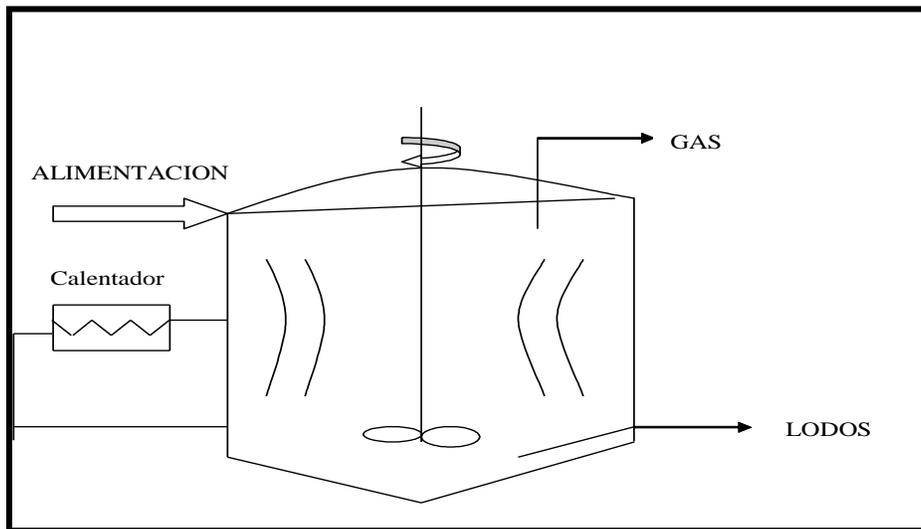
El siguiente desafío principal debe determinar si la economía y la fiabilidad de la producción de H_2 por este método son suficientemente atractivas para usos comerciales.

CAPÍTULO III

3.1 Fermentador

Se operó un fermentador a nivel laboratorio para el tratamiento de desechos orgánicos (frutas y verduras) de Ciudad Universitaria, UNAM. La metodología en la operación de sistemas anaerobios se basó en diferentes experiencias en investigaciones realizadas en otras anteriores (Castro-González, 2004). El esquema del reactor se muestra en la Figura 3.1 el cual es el diagrama base para el diseño experimental del fermentador.

Figura 3.1 Diagrama esquemático del diseño del fermentador utilizado



El reactor que se utilizó es un reactor CSTR el cual se alimentó con un inóculo de excremento de vaca para lograr la adaptación de las bacterias. El fermentador tiene un volumen de 7.9 L, fue construido con un tubo de acrílico de 12 cm de diámetro interno, 2 mm de espesor, 97 cm de altura, el cual está encaquetado con otro tubo de acrílico de 20cm de diámetro (Figura 3.1). Por el espacio libre entre los dos tubos se introdujo agua caliente para mantener la temperatura dentro del reactor entre 35°C y 40°C. La Tabla 3.1

muestra un resumen de las especificaciones del reactor. El gas producido fue cuantificado mediante un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies 6890 Network GC System según las instrucciones del fabricante.

Se evaluó el rendimiento o productividad de hidrógeno como el cociente del volumen de hidrógeno producido por unidad de masa de material orgánico degradado medido como DQO. La inoculación del reactor se llevó a cabo mediante el calentamiento del esccremento de vaca según patente por la cual se calentó a ebullición por 3 h (Figura 3.2). A una temperatura entre 80°C y 90°C enfriándose a temperatura ambiente y posteriormente agregando agua, para separar el sobrenadante, el cual se mezcló junto con la carga orgánica (desechos de fruta y papa) en una proporción 1 : 5 respectivamente. Esta adaptación se llevó a cabo de una forma muy lenta y a una elevada concentración de materia orgánica y controlando las características fisicoquímicas.

Figura 3.2 Fermentador experimental



Tabla 3.1 Dimensiones del fermentador utilizado en la presente investigación

Parámetro	Dimensión
Volumen de trabajo (m ³)	7.9
Diámetro interno (cm)	10
Espesor de la pared (mm)	2
Altura (cm)	97
Altura chaqueta (cm)	97
Diámetro interno de la chaqueta (cm)	20
Espesor de la pared (mm)	2

Una segunda etapa del experimento consistió en implementar kitazatos como reactores, para tener un mayor control de parámetros probando a diferentes pH's, agitación (rpm) y cargas orgánicas. Los kitazatos tienen un volumen de 500 mL son de cristal templado, tienen en la base una parrilla eléctrica para mantenerse a una temperatura óptima (37 °C) y con una regulación de la agitación (en rpm), con una salida en la parte superior para la recolección del gas, como se muestra en la Figura 3.3 éstos reactores operan bajo el mismo principio que el reactor anterior, la agitación se inició con 10 rpm a 120 rpm.

Figura 3.3 Arreglo de sistemas fermentadores de menor tamaño



3.2 Caracterización de la materia orgánica

La materia orgánica a alimentar el reactor, estuvo compuesta por frutas de desperdicio. A la cual se le realizó el análisis de caracterización Físicoquímica, el cual se puede observar en la Tabla 3.2 La caracterización de la materia orgánica se hizo de acuerdo al APHA, (1992) para los parámetros tales como sólidos totales, sólidos suspendidos totales, sólidos totales fijos, sólidos suspendidos fijos, sólidos disueltos totales, sólidos totales volátiles; sólidos suspendidos volátiles, sólidos disueltos volátiles; sólidos disueltos fijos, demanda química de oxígeno, pH y alcalinidad.

Tabla 3.2 Caracterización Físicoquímica del sustrato a utilizar para degradación a hidrógeno por el fermentador

Parámetro	Unidades	Promedio
pH	pH	5-7
Demanda química de oxígeno (DQO)	mg/L	35077
Sólidos Totales (ST)	mg/L	0.0850
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	mg/L	0.0527
Sólidos Totales Fijos (STF)	mg/L	0.0481
Sólidos Suspendidos Fijos (SSF)	mg/L	0.0050
Sólidos Disueltos Totales (SDT)	mg/L	0.0324
Sólidos Totales Volátiles (STV)	mg/L	0.0700
Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)	mg/L	0.0481
Sólidos Disueltos Volátiles (SDV)	mg/L	0.0220
Sólidos Disueltos Fijos (SDF)	mg/L	0.0106

3.3 Inoculación

Es necesario que el volumen del inóculo en el reactor y los kitazatos sea un 30% en relación a las dimensiones del reactor, con suficiente actividad, conteniendo los diferentes géneros de bacterias anaerobias y adaptadas a las propiedades específicas de la materia orgánica (frutas y verduras). En el caso particular del fermentador se preparó el inóculo

según patente NO.20050064567 de Lay y col. (1997) en la cual, se describe cómo el inóculo se debe calentar por 3 h a una temperatura de entre 80 °C y 90 °C. Posteriormente se le colocó agua y se dejó reposar. Se decantó, retirando el sobrenadante al cual se incorporó junto con la carga orgánica al reactor a 25 rpm a una temperatura de 37 °C. Para las pruebas en kitazatos se basó en el experimento de referencia de Hulshoff (2000) en el cual se describe cómo para un reactor RALLFA se prepara el inóculo.

En la presente investigación se le colocó agua suficiente al inóculo y se hirvió durante 30 minutos para inhibir la actividad metanogénica. De la misma forma se esperó a que se sedimentara y se separara el sobrenadante y se introdujo junto con la carga orgánica a los kitazatos a una temperatura de 37 °C y un pH controladas dependiendo de la etapa.

Otros factores que hay que tomar en cuenta son, en gran medida, las propiedades de la biomasa microbiana del inóculo. Los factores microbiológicos que influyen en el desempeño de un fermentador son:

1. Grupos de bacterias dominantes (hidrolíticas, acidogénicas, acetógenas y metanógenas) y la actividad bioquímica.
2. Velocidad de crecimiento de las especies productoras de hidrógeno.
3. Coeficiente de rendimiento de la biomasa
4. Velocidad de adaptación de las bacterias sobre las propiedades del agua residual
5. Capacidad para excretar polisacáridos (granulación, biopelícula)

Para lograr un rápido desarrollo del cultivo de bacterias, es necesario controlar:

- La temperatura, la cual debe estar idealmente en el intervalo de 30 °C y 40 °C para mantener condiciones mesofílicas.
- pH de 5 a 6.
- Balance de DQO (demanda química de oxígeno).
- Debido a la baja velocidad de crecimiento de las bacterias acidogénicas, el arranque de una instalación de este tipo puede requerir de varios meses, dependiendo sobre todo de la cantidad de biomasa activada inoculada.

3.4 Parámetros fisicoquímicos de control

Los parámetros seleccionados para evaluar la operación del reactor se eligieron teniendo en cuenta su importancia en el control de este tipo de procesos y su utilidad al momento de analizar los sistemas. A continuación se presenta en la Tabla 3.3 y 3.4 los análisis efectuados en el reactor durante el arranque y operación, en la fase líquida y gaseosa respectivamente. Para todos ellos se emplearon las metodologías aprobadas por APHA (1992).

3.4.1 Fase líquida

Las muestras de la fase líquida se tomaron teniendo cuidado de no variar los parámetros fisicoquímicos de control. Se esperó a que se sedimentara y se separara el sobrenadante para tomar nota de los parámetros y se introdujo la muestra en un recipiente sellado para evitar alguna contaminación. El fermentador fue monitoreado prácticamente durante todo el transcurso del experimento y usando las mismas precauciones.

Tabla 3.3 Análisis de la fase líquida en el fermentador experimental

Parámetros		Reactor anaerobio	Reactores de menor volumen
	Abreviación	Frecuencia (veces por semana)	
Temperatura	T	6	3
Potencial de hidrógeno	pH	3	4
Demanda química de oxígeno	DQO	3	3
Sólidos totales	ST	3	3
Sólidos suspendidos totales	SST	3	3
Sólidos totales fijos	STF	3	3
Sólidos suspendidos fijos	SSF	3	3
Sólidos disueltos totales	SDT	3	3
Sólidos totales volátiles	STV	3	3
Sólidos suspendidos volátiles	SSV	3	3
Sólidos disueltos volátiles	SDV	3	3
Sólidos disueltos fijos	SDF	3	2

3.4.2 Fase gaseosa

Las muestras de la fase gaseosa se tomaron con la ayuda de una jeringa cromatográfica de cierre luer, con la cual se inyectó del matraz de recuperación del biogás al tubo de almacenamiento de biogás y de ahí al cromatógrafo de gases para su análisis.

Tabla 3.4 Análisis de la fase gas en el fermentador experimental

	Reactor anaerobio	Reactor de menor volumen
Parámetro	Frecuencia (veces por semana)	Frecuencia (veces por semana)
Producción de biogás	5	5
H ₂ , CO ₂ y CH ₄	2	2

3.5 Determinación experimental de los gases

Las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica marca Agilent modelo 6890N (No. De serie: CN10437004), con una columna empacada Hayesep D 100/120 de 10'x 1/8" x 0.085" SS marca Alltech (No. De serie: 607081157) bajo las siguientes condiciones de análisis: La temperatura del horno se programó en modo isotérmico (a 60°C) y se mantuvo a esta temperatura durante 13 minutos. La temperatura del inyector se programó a 250°C, utilizándose nitrógeno como gas acarreador a modo de flujo constante de 12.0 mL/min, con un flujo total de nitrógeno de 12.9 mL/min. El detector se programó a 250°C, con un flujo de referencia de 30.0 mL/min y un flujo de gas auxiliar de 8.0 mL/min. Las muestras fueron inyectadas manualmente.

Para la identificación y cuantificación de los gases se utilizaron estándares de calibración. Para el hidrógeno se utilizó un estándar de 99.99% de pureza marca Matheson Tri Gas (No. De lote: 109-80-00412-A5) y para el dióxido de carbono se utilizó un estándar de 99.8% de pureza (No. De lote: 109-70-04839-A3).

CAPÍTULO IV

4.1 Cinéticas

El inicio de la cinética se hace a partir del momento de agregar el sustrato al inóculo, además los experimentos se hicieron por duplicado y con un control sin sustrato. Posteriormente por medio de cromatografía de gases, se determinó cualitativamente y cuantitativamente el hidrógeno de los tubos.

El tipo de alimentación usado tuvo un efecto particular al igual que el inóculo presentado con condiciones de temperatura, pH y concentraciones controladas.

4.2 Modelos cinéticos

Un ejemplo de modelo cinético es el modelo utilizado por Kaushik (2005). El sustrato y los perfiles de concentración de la biomasa son utilizados para averiguar los valores simulados de la concentración del sustrato como una función de t , de esta forma la siguiente expresión fue usada:

$$\mu_{max}(X_0 + Y_{x/s}S_0). t$$
$$= [X_0 + Y_{x/s}(S_0 + K_s)] \ln \left[\frac{X_0 + Y_{x/s}(S_0 - S)}{X_0} \right] - K_s Y_{x/s} \ln \frac{S}{S_0} \dots\dots\dots \text{ec. [4-1]}$$

De esta expresión, el perfil de sustrato simulado con la t fue determinado usando el método de convergencia de sustituciones sucesivas de Wegstein sobre cada iteración. También los valores simulados de la concentración de masa de célula, X fueron calculados usando la relación siguiente:

$$X = X_0 + Y_{x/s}(S_0 - S) \dots\dots\dots ec. [4-2]$$

Dadas las altas concentraciones de sustrato y el índice de crecimiento microbiano. Se propuso un modelo de inhibición de sustrato:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_1}} \dots\dots\dots ec. [4-3]$$

Conociendo este modelo como el modelo de Andrés se sugiere una relación no lineal entre μ el índice de crecimiento específico, y la concentración del sustrato S , (Jongenburger, 1990). Para calcular los valores de los parámetros cinéticos se utilizó un método de ecuación que describe la simulación de la biomasa y los perfiles de concentración del sustrato:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_1}} \cdot X \dots\dots\dots ec. [4-4]$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{\mu_{\max} K_s}{K_s + S + \frac{S^2}{K_1}} \cdot X \dots\dots\dots ec. [4-5]$$

Integrando para dar una expresión de los valores simulados de S como una función de t :

$$\begin{aligned} & \mu_{\max}(X_0 + Y_{x/s}S_0) \cdot t \\ &= [X_0 + Y_{x/s}(S_0 + K_s)] \cdot \text{Ln} \frac{X_0 + Y_{x/s}(S_0 - S)}{X_0} + K_s Y_{x/s} \text{Ln} \frac{S}{S_0} \\ &+ K_1(X_0 + Y_{x/s}S_0) \left[S - S_0 + \frac{(X_0 + Y_{x/s}S_0)}{Y_{x/s}} \right] \cdot \text{Ln} \left(\frac{X_0 + Y_{x/s}(S_0 - S)}{X_0} \right) \dots\dots\dots ec. [4-6] \end{aligned}$$

La cinética de crecimiento de la biomasa en esta etapa 2 por un modelo logístico se utiliza para estudiar la cinética de crecimiento de *R. sphaeroides O.U. 001* y la segunda etapa de la fermentación se interpretó como una ecuación logística. Recientemente este modelo logístico ha sido uno de los más populares debido a su calidad de impacto y extensamente ha sido usado en la descripción del crecimiento en microorganismos. El empleo del modelo logístico tiene una ventaja de representar la curva de crecimiento entera, el crecimiento exponencial y las fases estacionarias. En este trabajo, se desarrolló una ecuación basada en un modelo de crecimiento logístico asociada a la producción de hidrógeno en la fotofermentación. La ecuación logística para la concentración de células para un reactor tipo batch puede ser representada como:

$$X = \frac{X_0 e^{kc.t}}{1 - \frac{X_0}{X_{\max}}(1 - e^{kc.t})} \dots\dots\dots \text{ec. [4-7]}$$

Esta ecuación muestra la relación de biomasa y el tiempo de fermentación, que es usado en los datos experimentales de concentración de biomasa. Las constantes logísticas fueron determinadas usando un programa de software, *Encurve al experto 1.3*, y de esta forma se obtienen las curvas correspondientes (Lo, 2004).

La producción acumulativa de hidrógeno por la ecuación modificada de *Gompertz* en el fermentador puede ser modelada por la ecuación modificada de *Gompertz*, que puede ser escrita como:

$$H(t) = P \exp \left(- \exp \left(\frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right) \right) \dots\dots\dots \text{ec. [4-8]}$$

Ésta ecuación se consideró para ser una ecuación conveniente que tuviera la capacidad de describir el progreso de producción de gas acumulado durante el experimento, donde la H(t) representa el volumen de producción del hidrógeno (en mL), P el potencial de producción del gas (mL), R_m(mL/h) la producción máxima de biogás, λ(h) el tiempo de retraso, t el tiempo de incubación en (h) y e, el exp(1)= 2.718. La curva de producción típica acumulativa de hidrógeno no lineal fue modelada por la ecuación. Los valores de P,

Rm (para cada experimento) fueron determinados integrando los datos de producción de hidrógeno para una ecuación específica.

La fermentación oscura en la etapa 1 fue estudiada usando MYG medio que tiene la glucosa como su principal sustrato. Como ya ha sido relatado durante la fermentación oscura con pH's iniciales de 6.5 ± 2 y una temperatura de 37°C se obtiene una productividad máxima de hidrógeno, por *E. cloacae DM11*, estos parámetros fueron mantenidos en ese estudio. El volumen acumulativo de producción de hidrógeno se utilizó para aumentar la concentración de glucosa inicial en el medio.

Sin embargo, arriba del 1% (de peso/volumen) de concentración de glucosa inicial ocurrió una disminución de la producción de hidrógeno. Con el 1% (de peso/volumen) de concentración de glucosa, la producción molar de hidrógeno producido era de $3.31 \text{ molH}_2/\text{mol}$ glucosa asumiendo condiciones de PTN. Basado en la utilización de glucosa al 74% y una pureza del hidrógeno de 88%.

Tseng (2005), observó una tendencia similar entre la concentración de sustrato y la producción acumulativa de hidrógeno en la cual la producción máxima acumulativa fue encontrada en un 4% (de peso/volumen) de concentración de melaza que usa un medio de cultivo variado. El volumen acumulativo de producción de hidrógeno también alcanzó su máximo con el 1% (de peso/volumen) de concentración de glucosa inicial comparada con las concentraciones más altas.

Ya se ha relatado que la inhibición de sustrato se hace predominante cuando la concentración de glucosa es más alta porque esto modifica las vías metabólicas. La producción de H_2 más baja indica que el flujo de carbón en altas concentraciones de glucosa se debe a la producción de subproductos como el etanol y/o ácidos orgánicos. Ya que la producción de alcohol implica el consumo de hidrógeno en forma que reduce los equivalentes como NADH. Es inevitable que las condiciones de fermentación favorezcan el metabolismo de azúcar a alcoholes y reduzcan la producción de hidrógeno.

Lay y col. (2000), también estudiaron el sustrato y la inhibición de producto de producción de hidrógeno durante la fermentación de sacarosa por la bacteria *thermophilic*

Caldicellulosiruptor saccharolyticus. Ellos encontraron que el hidrógeno es un inhibidor fuerte, cuando se acumula en el medio de cultivo. Sin embargo, el grado de inhibición por parte del hidrógeno era dependiente de la densidad del cultivo.

En ese estudio la cinética en la etapa 1 por el modelo de Monod fue usado para modelar la cinética de crecimiento de biomasa en la producción de hidrógeno que usa *E. cloacae DM11* en la etapa 1.

Los valores del índice de crecimiento específico (μ_{max}) y la saturación de la constante K_s fue estimada dando una ecuación linealizada.

La Figura 4.1 presenta datos experimentales y la predicción del modelo cinético para concentración de sustrato como una función de tiempo de propagación de reacción usando el modelo de Monod. Las condiciones experimentales de ese estudio son las siguientes: Operación tipo batch, volumen del medio de 250 mL, temperatura 37°C y pH inicial medio de 6.0 \pm 2.

Tabla 4.1 Resultados constantes cinéticas de una investigación utilizando sacarosa como sustrato (Lay y col., 2000).

Concentración de glucosa	P (mL H ₂)	Rm (mL/h)	λ (h)	Coefficiente de correlación	Suma residual al cuadrado	D^a
0.2	442	9.78	6.06	0.996	14.45	0.1538
0.4	455	8.47	12.63	0.996	15.99	0.1538
0.6	570.45	10.02	11.58	0.996	18.47	0.1474
0.8	752.38	2.32	3.34	0.996	15.99	0.4196
1	1019.38	13.92	4.04	0.996	29.047	0.2174
1.2	927.64	17.65	2.05	0.990	45.08	0.1538
1.4	796.73	14.14	1.00	0.992	34.82	0.2308

En la Figura (4.1) las condiciones experimentales de ese estudio son las siguientes: Operación tipo batch, volumen del medio de 250 mL, temperatura 37°C y pH inicial medio de 6.0.

La Figura (4.2) presenta datos experimentales y predicción del modelo cinético para la concentración de biomasa como una función de tiempo de propagación de reacción usando el modelo de Monod. Las condiciones experimentales de operación tipo batch, con un volumen del medio de 250 mL, temperatura 37°C y pH inicial medio de 6.0 y una constante de saturación de 0.40 /h y 5.51 g/L, respectivamente, usando la glucosa como sustrato. Tanto los valores de μ_{max} como K_s fueron encontrados más bajos que aquellos reportados por *E. cloacae* IIT-BT-08 ($\mu_{max} = 1.12/h$ y $K_s = 8.9$ g/L).

El índice de crecimiento máximo específico depende de la temperatura y el pH del medio. Aunque la temperatura fuera mantenida constante durante el experimento de crecimiento, el pH no fue controlado. Esto podría haber causado el valor reducido de μ_{max} .

Además, la saturación de la constante K_s y el índice de crecimiento máximo específico sostienen alguna importancia física.

Figuras 4.1 Datos experimentales de una investigación antecedente sobre la concentración del sustrato y biomasa versus tiempo, utilizando el modelo Monod (Lay y col., 2000)

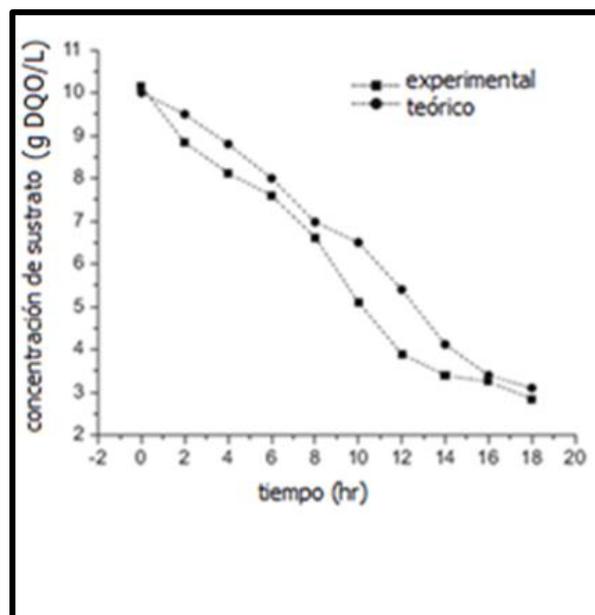
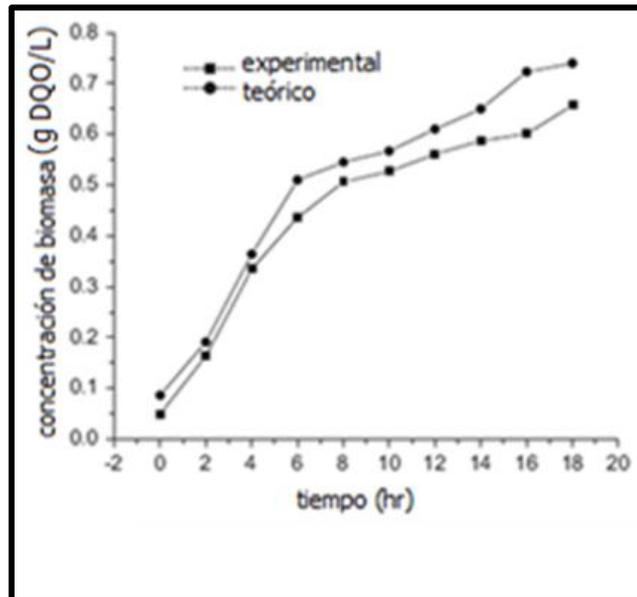


Figura 4.2 Consumo de sustrato en el tiempo en un experimento utilizando un modelo de inhibición de sustrato

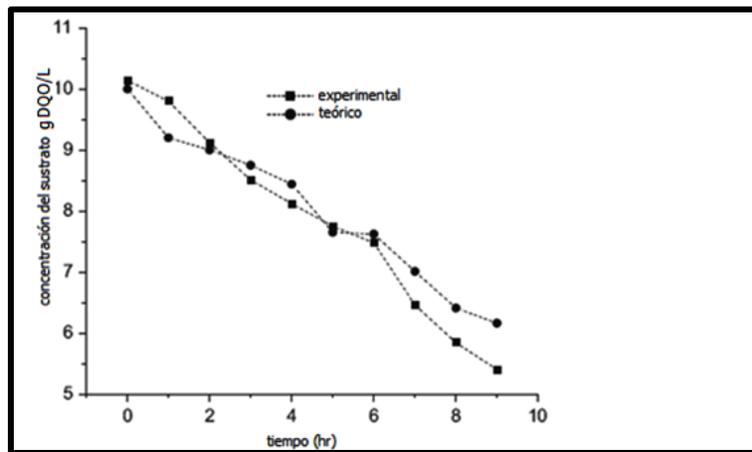


Las constantes cinéticas obtenidas pueden ser usadas como parámetros de diseño para la producción de hidrógeno en un bio-proceso con varias configuraciones del reactor. Por ejemplo, el valor de μ_{max} de 0.40 /h sugiere que el cultivo no sea realizado con valores de dilución cerca o por encima de 0.40 /h. Como la constante K_s con un valor de 5.51 g/L representa la concentración de sustrato requerida para alcanzar el 50% del índice de crecimiento máximo, esto podría utilizarse como una guía para ajustar la concentración de sustrato más eficiente en la alimentación.

Datos experimentales y aquellos predichos por el modelo de Monod para el sustrato y la concentración de biomasa en el curso del tiempo de propagación de reacción son presentados en las Figura 4.1 y 4.2 La pequeña desviación entre los valores experimentales y los simulados podrían ser inhibiciones de sustrato o del mismo producto. Sin embargo, Shen (2004) observó que la presencia de la fase de gas en el reactor en la presión parcial más alta de hidrógeno causó una producción baja de hidrógeno. Este hecho claramente ejemplifica la inhibición debido al gas de hidrógeno de producto. La inhibición de producto podría ser mitigada por mantener la presión parcial de hidrógeno en algunos niveles inferiores. En el efecto de inhibición del sustrato fue tomando en cuenta un modelo basado en la ecuación de Andrés en este estudio.

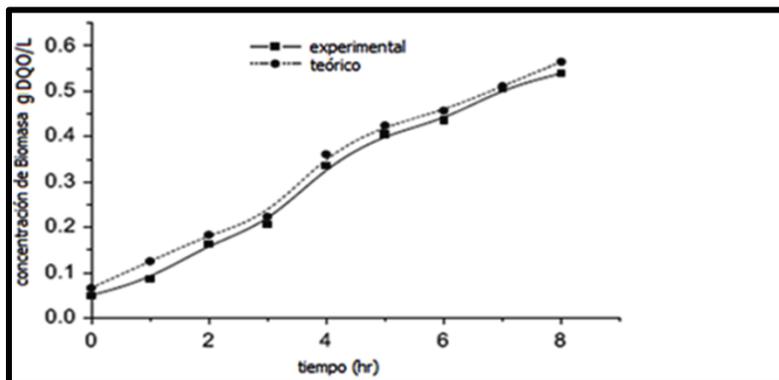
En la Figura 4.3 se muestra el perfil experimental y simulado de la concentración del sustrato como una función del tiempo de propagación de reacción usando un modelo de inhibición de sustrato. Las condiciones experimentales son de tipo batch, el volumen del medio es de 250 mL, con una temperatura de 37 °C y un pH inicial del medio de 6.0 ±2.

Figura 4.3 Concentración de biomasa en el tiempo, aplicando el modelo de inhibición del sustrato (Shen, 2004)



La Figura 4.4 presenta un perfil experimental y simulado del efecto de la concentración de biomasa en función del tiempo de propagación de reacción usando un modelo de inhibición del sustrato. Con una operación tipo batch, un volumen del medio de 250 mL, una temperatura de 37 °C y un pH inicial del medio de 6.0 ±2.

Figura 4.4 Perfil de la concentración de biomasa en un experimento utilizando como sustrato ácido acético (Shen, 2004)



Del modelo antes mencionado; la cinética de inhibición de la tensión *E. cloacae* IIT-BT-08, donde el modelo de Andrés modificado ha funcionado bien para predecir la inhibición de sustrato; los modelos desarrollados según las ecuaciones [4-4] y [4-5] fueron usados para estudiar los efectos de inhibición sobre la utilización de sustrato y perfiles de concentración de biomasa.

Las Figuras 4.3 y 4.4 representan los valores experimentales y simulados del efecto del sustrato y de la concentración de biomasa en función del tiempo de propagación de reacción usando el modelo de inhibición de sustrato. Estos valores tienen una similitud comparándolos con los resultados experimentales.

La pequeña desviación entre los datos experimentales y aquellos predichos por el modelo podrían deberse a la suposición que $Y_{x/s}$ la cual permaneció constante sobre el sistema independientemente del tiempo de fermentación. Esto se asumió omitiendo el efecto de energía de mantenimiento sobre el crecimiento de células y el metabolismo. Las pruebas de los métodos de discrepancia se aplicaron para averiguar la importancia estadística de los puntos de los datos experimentales y aquellos predichos por el modelo. Esto reveló que había pocas o ninguna prueba real que se opusiera a la hipótesis de que todo el residuo tenía una distribución arbitraria normal de error de menos del 5%.

La fotofermentación del medio gastado en la etapa 2 alimentada con glucosa expuso una alta concentración orgánica ácida (sobre 2,000 a 2,500 mg/L), predominantemente dada por el ácido acético con una pequeña cantidad de ácido butírico y etanol. Sin embargo, el medio fue usado para la foto-producción de hidrógeno en la segunda etapa independientemente de su composición y sin la separación de metabolitos. Las celdas de iluminación de *R. sphaeroides* O.U. 001 (conteniendo alrededor de 0.15 a 0.17 g/L de células), fueron inoculadas en un medio de fermentación oscura. Con el 1% (de peso/volumen) de concentración de glucosa en un volumen medio de MYG máximo acumulativo de hidrógeno correspondiente a la primera etapa. El medio gastado del mismo, fue usado para la fotofermentación en una segunda etapa subsecuente. La producción de hidrógeno en la segunda etapa fue de 1.5 a 1.72 molH₂/mol de ácido

acético. El ácido acético era por lo visto el sustrato exclusivo para la producción de hidrógeno en la segunda etapa.

Sin embargo, la producción total de hidrógeno en el proceso de la segunda etapa fue hecha sobre el contenido de glucosa inicial, ya que la glucosa, presente en el medio MYG de fermentación oscura, fue convertida al ácido acético y ningún sustrato adicional fue suministrado allí. La producción total de hidrógeno en el proceso de dos etapas con glucosa como sustrato inicial fue encontrada más alta comparándola a un proceso de una sola etapa. Rombouts (1990) ha hecho un informe tanto de la fermentación oscura como de la fotofermentación, usando *R. palustris P4*. La producción de conversión del acetato a H_2 , como se estimaba, fue de 2.4 a 2.8 mol H_2 /mol de acetato indicando que la cantidad total transformada de la glucosa a H_2 es mejor para un proceso de dos pasos.

Sin embargo, el valor de producción volumétrico de H_2 en la fotofermentación fue muy bajo para el proceso de dos etapas siendo un proceso económicamente factible. Además es un hecho que tanto la fermentación oscura como la fotofermentación tienen una implicación importante en el desarrollo del proceso para la producción económica de H_2 .

Se estudió el efecto de la concentración inicial del ácido acético en la foto-producción de hidrógeno, de cuatro sistemas tipo batch que tienen cuatro concentraciones diferentes de ácido acético. Un fotocultivo fue usado como inóculo con una concentración inicial de células de 0.17 células /L. El perfil de la concentración de biomasa con respecto al tiempo (Figura 4.5) indica que la concentración de biomasa aumenta considerablemente con una alta concentración inicial de ácido acético de 2.5 g/L para la corrida 4, mientras que para las corridas restantes hay un aumento sólo marginal de la concentración de biomasa con el aumento de la concentración de ácido acético.

Gündüz (2002) también divulgó que *R. palustris P4* podría utilizarse para remover acetato como fuente de carbón o de energía para el crecimiento de biomasa y la producción de hidrógeno en condiciones de luz.

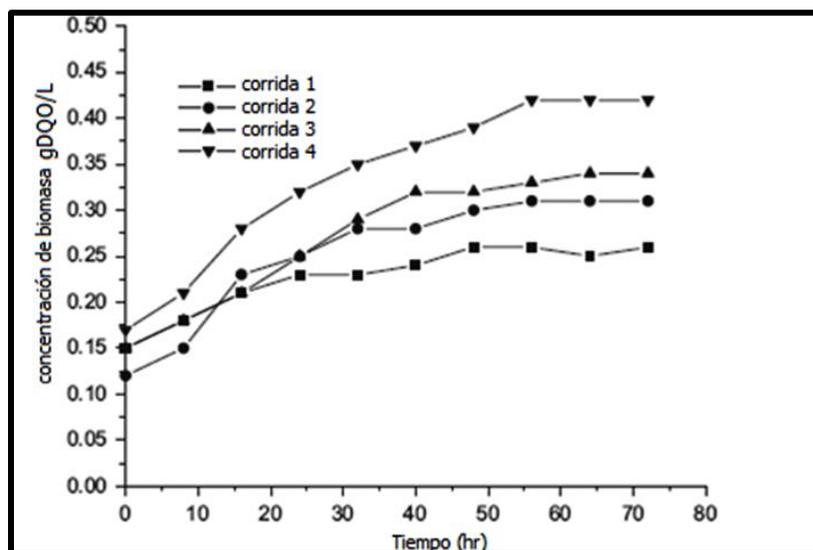
Para los experimentos de producción de hidrógeno tipo batch en la segunda etapa de fermentación de este estudio donde la concentración del sustrato inicial y el volumen del

inóculo son mantenidos constantes, el modelo logístico es una aproximación justa de la cinética de crecimiento (Saito-Taki, 1995).

Los parámetros de los modelos logísticos (k_c y X_{max}) para el crecimiento de *R. sphaeroides* O.U.001 varían en la concentración inicial que usan de ácido acético en el medio gastado de la etapa 1 y se muestra en la Tabla 4.2. El valor de R^2 , la cual cuantifica la dispersión de distribución, fue usado como una medida para una calidad óptima. Estos valores de R^2 para todo el modelo logístico estaban por encima de 0.98, indicando la excelencia del modelo con respecto en los datos experimentales. Tanto X_0 como los valores de X_{max} que son determinados por el modelo logístico y son bastante similares a los valores experimentales. Para una concentración inicial de ácido acético de 2.5 g/L en el medio gastado, el índice de crecimiento máximo específico se encontró más alto.

La Figura 4.5 muestra el perfil de concentración de biomasa variando la concentración inicial de ácido acético. La concentración de ácido acético (g/L) en la primera corrida fue de 0.35 g/L; en la segunda corrida fue de 0.55 g/L; en la tercera corrida fue de 0.95 g/L; en la cuarta corrida fue de 2.5 g/L a una temperatura de 34°C, una intensidad de luz de 5,000 \pm 500 A y un pH inicial del medio ajustado a 6.8.

Figura 4.5 Concentración de biomasa variando la concentración, (Saito-Taki, 1995).



Se trazaron curvas de producción variando la concentración inicial de la glucosa, como sustrato para obtener la producción acumulada de hidrógeno con la ayuda de la ecuación modificada de Gompertz. Por medio del programa de software, el experto de Curva 1.3 (Tabla 4.2) se eligieron los valores P , R_m y λ como los mejores datos de producción acumulativa de hidrógeno.

La magnitud total de la regresión obtenida en la gama 0.990-0.996 indicó una correlación fuerte con los datos experimentales. Los valores arrojados en la prueba de *Kolmogorov-Smirnov*, para determinar la distribución normal de residuos indicaron que todo el residual tenía una distribución normal, con un margen de error menor al 5%. Los valores de coeficientes diferentes son presentados en Tabla 4.2 Esto revela que el potencial de producción máximo de hidrógeno fue obtenido con el 1% (de p/v) de concentración de glucosa, sin embargo el valor de producción era mayor con una concentración de glucosa del 1.2%.

El valor de R_m , era de 13.917 mL/h que es mucho más alto que aquellos hechos en el informe por Kargi (2006) y Morimoto (1992) pero el valor de λ , es similar con aquellos obtenidos en la literatura.

Sin embargo, es algo difícil de comparar los valores de estos parámetros aún en condiciones comparables cuando los microorganismos y los sustratos son diferentes. La curva de producción acumulativa de hidrógeno de la fotofermentación del medio utilizado también fue interpretada por la ecuación modificada de Gompertz. El medio que fue usado en esta etapa fue obtenido por medio de un sistema tipo batch de fermentación oscura que contiene como sustrato, glucosa al 1% (en p/v). Los valores de P , R_m y λ fueron determinados como los mejores datos de producción acumulativos de hidrógeno para la ecuación que usa el mismo software. Tanto la magnitud total de regresión (0.996), como el valor de D en la prueba de *Kolmogorov-Smirnov* concuerdan bien con los datos experimentales. En la Tabla 4.3 se presenta los valores de los diferentes coeficientes.

Tabla 4.2 Parámetros cinéticos utilizando la ecuación logística para una investigación que utiliza ácido acético en una fermentación oscura produciendo hidrógeno (Kargi, 2006).

Número de corridas	Concentración inicial de ácido acético	Xmax (g/L)	Xo (g/L)	Kc (h)	R ²
1	2.5	0.44	0.06	0.09	0.993
2	0.95	0.39	0.045	0.05	0.998
3	0.55	0.31	0.06	0.04	0.992
4	0.35	0.25	0.04	0.05	0.991

Tabla 4.3 Parámetros cinéticos de la producción acumulada de hidrógeno utilizando la ecuación de Gompertz (Kargi, 2006).

Parámetros cinéticos	Valores
P (mL H ₂)	615.75
R(mL/h)	16.15
λ (h)	14.32
Coefficiente de correlación	0.996
Suma residual de cuadrados	18.47
D (kolmogorov Smirnov test)	0.161

4.3 Modelos cinéticos para la producción de hidrógeno

El siguiente desarrollo describe un modelo de un proceso tipo batch para la producción de hidrógeno.

En general, la reacción para la producción de hidrógeno con un sustrato puede ser formulada así:



Donde la bacteria, X, consume el sustrato, S, para producir bacterias y productos, Pi. En pruebas batch, los niveles de crecimiento de las bacterias, el consumo de sustrato y la formación de producto generalmente son expresados de la siguiente manera:

$$r_x = -Y_x \times r_s \dots \text{ec. [4-10]}$$

$$r_{Pi} = -Y_{Pi} \times r_s \dots \text{ec. [4-11]}$$

$$r_{Pi} = \frac{P_i}{Y_x} \times r_s \dots \text{ec. [4-12]}$$

Donde r_s , r_x y r_{Pi} son los niveles de consumo del sustrato, el crecimiento bacteriano y la formación del producto respectivamente, Y_x es la producción de células y Y_{Pi} es la producción de los productos (Abusam, 2002).

Existen muchos modelos matemáticos que podrían usarse para describir el crecimiento de las bacterias en un cultivo tipo batch. Entre ellos, una ecuación logística puede ser expresada como

$$X = X_0 + \int_0^t r_x dt = X_0 + \frac{A}{1 + \exp[(\mu_m X_e / A)(\lambda - t) + 1]} \dots \text{ec. [4-13]}$$

El sustrato consumido podría ser calculado usando la ecuación siguiente:

$$\begin{aligned} S &= \int_0^t r_s dt = - \int_0^t \frac{r_x}{Y_x} dt = - \frac{1}{Y_x} \int_0^t r_x dt \\ &= - \frac{1}{Y_x} \times \frac{A}{1 + \exp[(\mu_m X_e / A)(\lambda - t) + 1]} \end{aligned}$$

$$= \frac{\frac{-A}{Y_x}}{1 + \exp^{-[(\mu m/Y_x) \times e / -A/Y_x](\lambda - t) + 1}} \dots \text{ec. [4-14]}$$

El término $\frac{-A}{Y_x}$ puede ser substituido por S_{\max} , definido como el potencial máximo del sustrato consumido, mientras $\mu m/Y_x$ puede ser definido como el grado máximo de sustrato degradado, R_{\max} .

Por lo tanto, la ecuación [4-6] puede escribirse también como:

$$S = \frac{S_{\max}}{1 + \exp^{-[(R_{\max}) \times e / S_{\max}](\lambda - t) + 1}} \dots \text{ec. [4-15]}$$

De un modo similar, la ecuación siguiente fue obtenida:

$$\begin{aligned} P_i &= \int_0^t r_{Pi} dt = \int_0^t \frac{Y_{Pi}}{Y_x} \times r_x dt = \frac{Y_{Pi}}{Y_x} \int_0^t r_x dt \\ &= \frac{A}{1 + \exp^{-[(\mu m X e / A)(\lambda - t) + 1]}} \\ &= \frac{A \cdot \frac{Y_{Pi}}{Y_x}}{1 + \exp^{-[(\mu m \cdot \frac{Y_{Pi}}{Y_x}) \times e / A \cdot \frac{Y_{Pi}}{Y_x}](\lambda - t) + 1}} \dots \text{ec. [4-16]} \end{aligned}$$

El término $\frac{Y_{Pi}}{Y_x}$ puede ser substituido por P_{\max} ; definido como el producto potencial máximo de formación, mientras que el término $\mu m \cdot \frac{Y_{Pi}}{Y_x}$ puede ser definido como el rango máximo de producto formado, $R_{\max, i}$.

Lo que resulta en la ecuación siguiente:

$$P_i = \frac{P_{\max, i}}{1 + \exp^{-[(R_{\max, i}) \times e / P_{\max, i}](\lambda - t) + 1}} \dots \text{ec. [4-17]}$$

En este trabajo, las ecuaciones [4-16] y [4-17] fueron usadas para describir los procesos acidogénicos en la producción de hidrógeno. Otro método de análisis de resultados puede ser la ecuación modificada de Gompertz.

En este estudio, las curvas de producción acumulativas de hidrógeno en lo que concierne al tiempo fueron obtenidas primero de los experimentos de producción de hidrógeno; por lo que la ecuación modificada de Gompertz fue aplicada para determinar el potencial de producción de hidrógeno, la tasa de producción de hidrógeno (R), y la fase de retraso (Grau, 1984).

$$H(t) = H \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R \cdot e}{H} \cdot (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \dots \dots \dots \text{ec. [4-18]}$$

Donde la H(t) es la producción acumulada de hidrógeno (en mL), t es el tiempo de fase de retraso (h); la H es el potencial de producción de hidrógeno (en mL); la R es el dato de producción de hidrógeno (mL/h); y la e es exp (1), p. ej. 2.71828. Los parámetros pueden ser estimados reduciendo al mínimo la suma de errores al cuadrado (SSE) entre los datos experimentales y la valoración de los modelos. Esta valoración puede ser realizada usando la función de 'Solver' en Microsoft Excel.

La importancia de la estimación de los parámetros es por lo general probada por el análisis de discrepancia, ANOVA (Giraldo-Gómez y col., 2002).

CAPÍTULO V

5.1 Obtención e interpretación de datos cinéticos en un reactor intermitente mezclado

La cinética de cada paso de una reacción o proceso se puede analizar en términos de una limitante. En la digestión, Rombouts (1990) ha confirmado que la limitante es la metanización de los ácidos grasos de cadenas cortas o largas. Por ello, el proceso global se puede describir en forma adecuada por la cinética de la tercera etapa del proceso de digestión.

La representación más conocida en bioquímica es la reacción autocatalítica:



Donde M_0 son los microorganismos iniciales (mgSSV_{inicial}/L)

M son los microorganismos finales (mgSSV_{final}/L)

S representa al sustrato o reactivo utilizado (mgDQO_{inicial}/L)

Y que se representa por las siguientes ecuaciones:

$$r_m = \frac{dM}{dt} = Y \left(-\frac{dS}{dt} \right) - b \cdot M \dots \text{ec. [5-1]}$$

$$r_m = \mu \cdot M \dots \text{ec. [5-2]}$$

Donde

r_m = rapidez de crecimiento de microorganismos. (mg/L³.T)

M = concentración de microorganismos. (mg/L³)

T = tiempo. (h)

b = constante específica de decaimiento. (h⁻¹)

Y = coeficiente de rendimiento. (mgSSV/mgDQO)

μ = rapidez específica de crecimiento. (h⁻¹)

Combinando las ecuaciones (5-1) y (5-2) se obtiene:

$$r_s = -\frac{dS}{dt} = \frac{M}{Y} \cdot (\mu + b) \dots \dots \dots \text{ec. [5-3]}$$

r_s = Rapidez de degradación de sustrato. (mg/L³h)

Se han propuestos diferentes ecuaciones para definir μ en la digestión, los siguientes modelos son algunos entre muchos otros ya citados:

Ecuación de Grau

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{S} - b \dots \dots \dots \text{ec. [5-4]}$$

Ecuación de Monod

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S} - b \dots \dots \dots \text{ec. [5-5]}$$

Ecuación de Contois

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{a \cdot S_0 + S} - b; a = \frac{K_s}{S_0} \dots \dots \dots \text{ec. [5-6]}$$

Definiendo ahora la siguiente variable:

$$q = \frac{1}{M} \cdot \frac{dS}{dt} = -\frac{\mu}{Y} = -\frac{\mu_{max}}{Y} \cdot \frac{\mu}{\mu_{max}} = -q_{max} \cdot \frac{\mu}{\mu_{max}} \dots \dots \dots \text{ec. [5-7]}$$

Donde q es la tasa de utilización de sustrato por unidad de peso de microorganismos, q_{max} es la tasa máxima de utilización de sustrato por unidad de peso de microorganismos.

5.1.1 Determinación de constantes cinéticas

Una ecuación cinética caracteriza la velocidad de reacción. Esta expresión se puede sugerir por consideraciones teóricas o puede ser el resultado de un procedimiento empírico de ajuste de curvas (Hu, 1991).

La determinación de la ecuación de velocidad consta de dos pasos. Primero, se encuentra la dependencia de la concentración a una temperatura fija, después se encuentra la dependencia de las constantes con la temperatura.

La información empírica se puede determinar en el laboratorio mediante los bio-reactores intermitentes.

Los reactores intermitentes son muy sencillos de operar y de escalar. Se deben usar para obtener datos cinéticos en reacciones homogéneas.

En el laboratorio se pueden disponer de reactores que se aproximan al comportamiento ideal por su pequeño tamaño y fácil manejo. A medida que se usan reactores más grandes, empiezan a intervenir otros factores que afectan a la reacción y pueden desviar el comportamiento ideal. Por ello, las ecuaciones de rapidez obtenidas en laboratorio se usan como referencia para obtener su comportamiento a nivel prototipo (Chudoba, 1984.)

Antes que las constantes de reacción, se debe seleccionar el reactor más conveniente para la reacción. Esto es esencial, pues la ecuación de diseño depende del reactor elegido.

Las ecuaciones de diseño son:

Para el reactor intermitente

$$T = \frac{\ln \frac{S_0}{S}}{r_s} \dots \dots \dots \text{ec. [5-8]}$$

Donde

S es la concentración de reactivo

r_s es la expresión de rapidez de reacción

Existe una gran confusión en la información obtenida, ya que cada autor maneja una terminología diferente y un planteamiento diferente de las ecuaciones.

5.1.2 Determinación del orden de reacción

Para el estudio de la cinética de una reacción, es necesario empezar por saber que una reacción química es la transformación de los reactivos en productos, para que esta transformación se dé, se debe producir una reordenación de los enlaces, es decir una reacción química, pero ésta reacción tiene una velocidad de reacción propia. En un gran número de reacciones, la velocidad de reacción es igual a una constante cinética (K) cuyas unidades son por el producto de las concentraciones elevadas a unos exponentes que se llaman órdenes de reacción. Así lo indica la Ley de rapidez de reacción que es una expresión matemática que relaciona el cambio en concentración de un reactivo o producto por unidad de tiempo y que se determina experimentalmente. Siempre tiene un valor positivo y es proporcional a la concentración.

$$\text{rapidez de rx} = r = \pm \frac{\Delta[A]}{\Delta t} = \pm \frac{d[A]}{dt} = f([A],[B],[C]...) = k[A]^{\alpha}[B]^{\beta}[C]^{\gamma}...$$

La constante específica de rapidez, k es la constante de proporcionalidad entre la rapidez de reacción experimental y las concentraciones elevadas a exponentes dados y es función de la temperatura, agente catalítico e independiente de la concentración. El orden de reacción es el exponente de cada concentración en la expresión de la ley de rapidez, alfa, beta, gama (no existe relación sencilla entre los coeficientes estequiométricos y los órdenes de reacción).

El orden total de reacción - suma de los órdenes individuales: alfa + beta + gama ..., puede ser positivo, negativo, fracción ó cero.

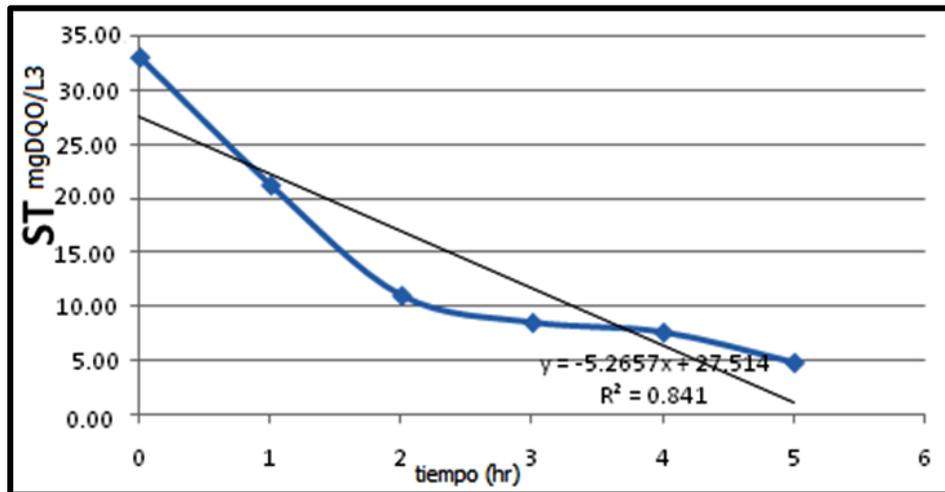
Para determinar el orden de reacción se utilizó el Método gráfico de rapidez integrada - usando el cálculo integral de las leyes de rapidez que tienen una ecuación específica dependiendo del orden de la reacción para reacciones del tipo:

$$r = \pm \frac{\Delta[A]}{\Delta t} = \pm \frac{d[A]}{dt} = k[A]^n$$

Para determinar si el orden de reacción es 0 se grafica los datos experimentales obtenidos de sólidos totales con respecto al tiempo y se traza la curva de tendencia que sea más afín a la curva obtenida. Dependiendo de la cercanía del coeficiente de correlación a 1 se define el orden de reacción.

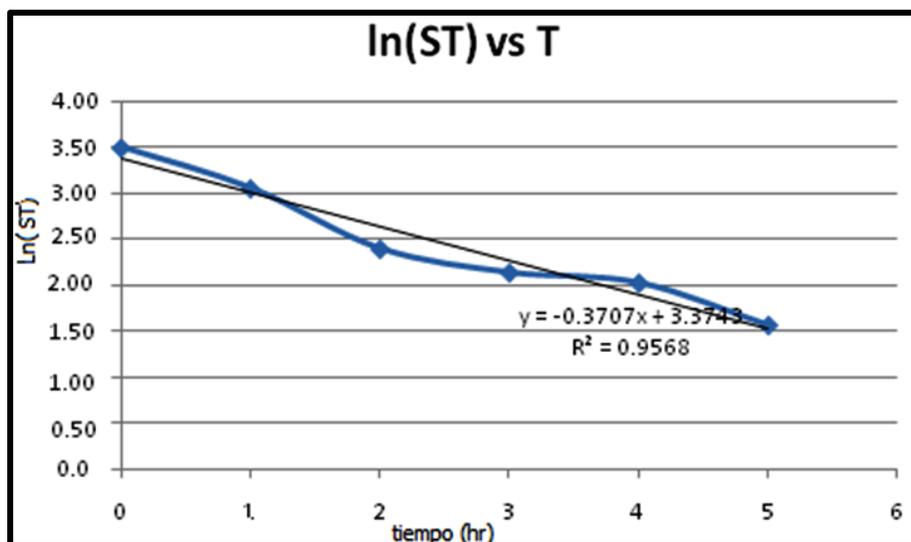
En la Figura 5.1 Se grafico los ST frente al tiempo, al linearizar la curva y calcular su ecuación, ésta nos arroja un coeficiente de correlación de 0.841.

Figura 5.1 Determinación del orden cero de reacción para los resultados experimentales



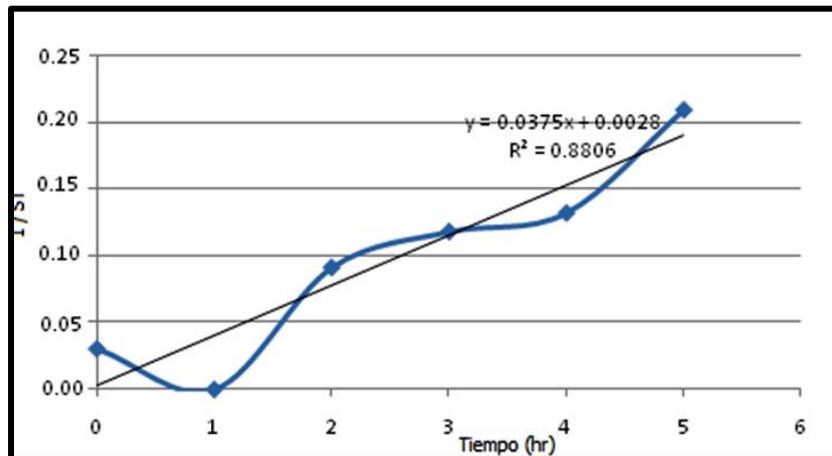
La Figura 5.2 al graficar el logaritmo de ST con respecto al tiempo, al linearizar la curva y calcular su ecuación, ésta nos arroja coeficiente de correlación de 0.9568. Éste último resultado es apreciable para definir nuestra reacción como una reacción de orden 1, se justificará este resultado con la Figura 5.3

Figura 5.2 Determinación de primer orden de reacción para los resultados experimentales



Efectivamente al calcular el inverso de los sólidos totales frente al tiempo, al linearizar la curva y calcular su ecuación, ésta nos arroja un coeficiente de correlación bastante lejano a 1 lo que ratifica que el orden de reacción es de 1.

Figura 5.3 Determinación del segundo orden de reacción para los resultados experimentales.



Se puede observar que para la relación simple de rapidez de reacción y concentración de reactivo, el sistema se comportó como una cinética de primer orden es decir con una relación de rapidez de reacción directamente proporcional a la concentración de reactivo (materia orgánica).

5.1.3 Algoritmo para determinar las constantes cinéticas

Partiendo de las ecuaciones planteadas anteriormente para la fermentación oscura se realiza lo siguiente:

- 1.- Las constantes Y y b se obtienen arreglando la ecuación [5-1] de la siguiente manera:

Ecuación [5-1] / M:

$$\frac{1}{M} \left(\frac{dM}{dt} \right) = Y \cdot \frac{dS}{dt} - b \dots \text{ec. [5-9]}$$

En reactores mezclados se tiene que:

$$\frac{1}{M} \left(\frac{dM}{dt} \right) = \theta_c^{-1} = \text{inverso de tiempo de retención celular} \dots \text{ec. [5-10]}$$

[5-10] en [5-9]:

$$\theta_c^{-1} = Y \cdot \frac{dS}{dt} - b \dots \text{ec. [5-11]}$$

En reactor intermitente se tiene:

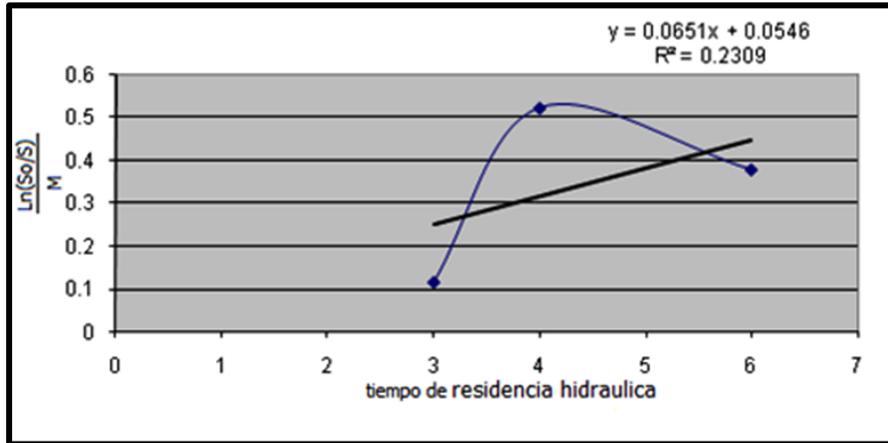
$$r_s = - \frac{dS}{dt} = \frac{\ln \left(\frac{S_0}{S} \right)}{\theta}$$

Arreglando:

$$\frac{\ln \left(\frac{S_0}{S} \right)}{M} = \frac{b}{Y} \cdot \theta_c + \frac{1}{Y} \dots \text{ec. [5-12]}$$

Como se puede ver, las constantes se determinan graficando $\frac{\ln \left(\frac{S_0}{S} \right)}{M}$ en las ordenadas contra θ_c en las abscisas (Figura 5.4), en donde la pendiente de la línea recta corresponde a Y y su ordenada al origen a b .

Figura 5.4 Determinación gráfica de las constantes cinéticas según el algoritmo aplicado para el experimento.



En la siguiente Tabla se muestran las constantes cinéticas obtenidas de la Figura 5.4, se calculó la pendiente de la línea recta correspondiente a Y y su ordenada al origen b.

Tabla 5.1 Concentrado de los resultados de los parámetros cinéticos calculados con el algoritmo empleado para el experimento.

b/Y	1/Y	b	Y
0.0095	0.0536	0.177238806	18.6567164

El segundo paso es obtener los parámetros K_S y μ_{max} los cuales se obtienen de la siguiente manera:

- Se elige la ecuación de diseño que corresponda al reactor en cuestión.
- Para definir μ se escoge uno de los modelos previamente mencionados.
- Se sustituye la definición de μ seleccionada en la ecuación.
- La expresión de definición de r que queda del punto anterior se sustituye en la ecuación de diseño correspondiente.

- e) La ecuación resultante, se arregla como convenga para poder obtener las constantes q_{max} y K_s . Con el valor de Y se calcula el valor de μ_{max} y con el valor de μ_{max} se puede obtener el valor de q_{max} .

5.1.3.1. Modelo de Monod

Como ejemplo se menciona la ecuación que se obtiene al aplicar el modelo de Monod para un reactor intermitente mezclado.

a) Ecuación seleccionada: $\theta_c = \frac{\ln \frac{S_0}{S}}{r_s}$

b) Ecuación de Monod: $\mu = (\mu_{max} \cdot S / (K_s + S)) - b$

c) Expresión resultante: $r_s = \mu_{max} \cdot M \cdot \frac{S}{Y(K_s + S)}$

d) Expresión resultante: $\theta_c = Y (K_s + S) \cdot \ln(S_0/S) / (\mu_{max} \cdot M \cdot S)$

e) Resultado:

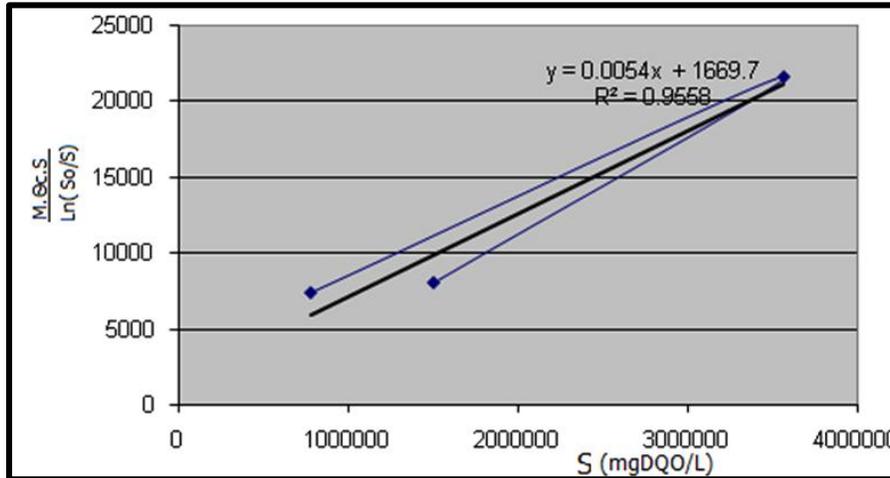
$$S = -K_s + q_{max} \cdot \left(\frac{M \cdot \theta_c \cdot S}{\ln \left(\frac{S_0}{S} \right)} \right) \dots \dots \dots \text{ec. [5-13]}$$

Donde

$$q_{max} = \frac{\mu_{max}}{Y}$$

Como se puede ver, las constantes se determinan graficando $\left(\frac{M \cdot \theta_c \cdot S}{\ln \left(\frac{S_0}{S} \right)} \right)$ en la ordenada con respecto a S en las abscisas (Figura 5.5).

Figura 5.5 Determinación gráfica de las constantes cinéticas para el modelo Monod para el experimento.



En la siguiente Tabla se presentan los resultados de la Figura 5.5 en donde la pendiente de la línea recta corresponde a q_{max} y su ordenada al origen corresponde a $-K_s$.

Tabla 5.2 Concentrado de los resultados de los parámetros cinéticos calculados utilizando el modelo de Monod.

q_{max}	K_s	μ_{max}
0.0054	-1669.7	0.100746269

La secuencia aplicada al modelo Monod debe aplicarse a varios modelos para comparar y decidir cual ecuación y modelo se acopla más a los resultados obtenidos.

5.1.3.2 Modelo de Contois

Se aplica la misma secuencia de cálculo para determinar las variables cinéticas del modelo de Contois

- a) Ecuación seleccionada: $\theta_c = \frac{\ln \frac{S_0}{S}}{r_s}$
- b) Ecuación de Contois: $\mu = \left(\frac{\mu_{max} \cdot S}{a \cdot S_0 + S} \right) - b$; donde $a = K_s/S_0$ y $B = 1/Y(1+a)$
- c) Expresión resultante: $r_s = \mu_{max} \cdot M \cdot S / (Y(a \cdot S_0 + S))$
- d) Expresión resultante: $\theta_c = Y(a \cdot S_0 + S) \cdot \ln(S_0/S) / (\mu_{max} \cdot M \cdot S)$
- e) Resultado:

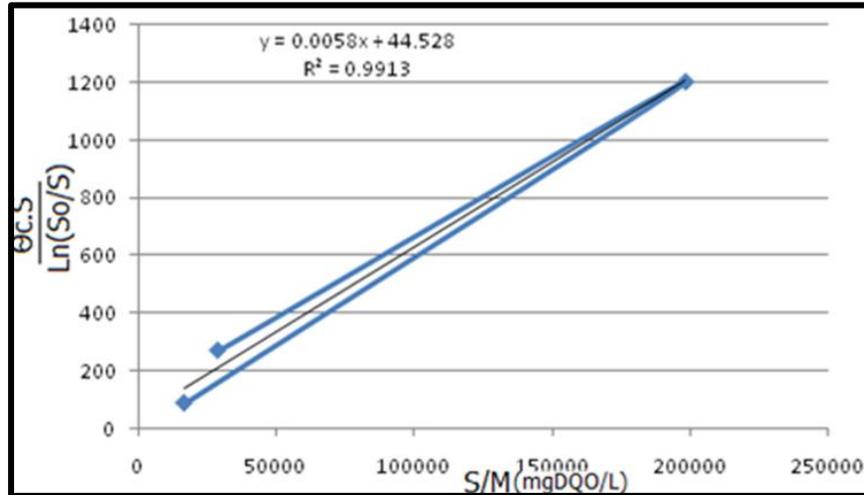
$$S/M = -B + Um/Y \cdot \left(\frac{\theta_c \cdot S}{\ln \left(\frac{S_0}{S} \right)} \right) \dots \dots \dots \text{ec. [5-14]}$$

Donde

$$Um = \frac{-\mu_{max}}{1 + a}$$

Como se puede ver, las constantes se determinan graficando $\left(\frac{\theta_c \cdot S}{\ln \left(\frac{S_0}{S} \right)} \right)$, en las ordenadas contra S/M en las abscisas.

Figura 5.6 Determinación gráfica de las constantes cinéticas para el modelo Contois para el experimento



En la Tabla 5.3 se presentan los datos reportados a partir de la Figura 5.6 en donde la pendiente de la línea recta corresponde a U_m/Y y su ordenada al origen corresponde a $-B$, estos últimos parámetros cinéticos correspondientes al modelo de Contois.

Tabla 5.3 Concentrado de los resultados de los parámetros cinéticos calculados utilizando el modelo de Contois

U_m	0.1082	
B	-44.53	gDQO/gSSV
a	-1.0012	
K_s	-33455.87957	
μ_{max}	0.000129	
q_{max}	0.00000692	

5.1.3.3 Modelo Chen y Hashimoto

A continuación se presenta la misma secuencia de cálculo pero ahora aplicada al modelo de Chen y Hashimoto para un reactor intermitente mezclado.

a) Ecuación seleccionada: $\theta_c = \frac{\ln \frac{S_0}{S}}{r_s}$

b) Ecuación de Chen y Hashimoto $\mu = (\mu_{max} \cdot S / (K \cdot S_0 + (1 - K) \cdot S)) - b$
 donde $K = a / (1 + a)$ $S_0 / (Ks + S_0)$

c) Expresión resultante: $r_s = \mu_{max} \cdot M \cdot \frac{S}{Y(K \cdot S_0 + (1 - K) \cdot S)}$

d) Expresión resultante: $\theta_c = Y (K \cdot S_0 + (1 - K) \cdot S) \cdot \ln(S_0/S) / (\mu_{max} \cdot M \cdot S)$

e) Resultado:

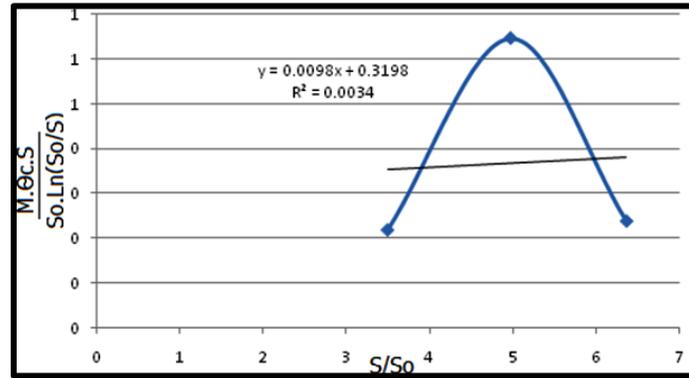
$$S/S_0 = -K/(1 - K) + \frac{q_{max}}{1 - K} \cdot \left(\frac{M \cdot \theta_c \cdot S}{S_0 \cdot \ln(\frac{S_0}{S})} \right) \dots \text{ec. [5-15]}$$

Donde

$$q_{max} = \frac{\mu_{max}}{Y}$$

Como se puede ver, las constantes se determinan graficando $\left(\frac{M \cdot \theta_c \cdot S}{S_0 \cdot \ln(\frac{S_0}{S})} \right)$, en las ordenadas contra S/S_0 en las abscisas.

Figura 5.7 Determinación gráfica de las constantes cinéticas para el modelo Chen y Hashimoto para el experimento



La Tabla 5.4 se presentan los datos reportados a partir de la Figura 5.7 en donde la pendiente de la línea recta corresponde a $\frac{q_{max}}{1-K}$ y su ordenada al origen corresponde a $-K/(1-K)$. De esta manera se determinan las constantes cinéticas correspondientes al modelo de Chen y Hashimoto.

Tabla 5.4 Concentrado de los resultados de los parámetros cinéticos calculados utilizando el modelo Chen y Hashimoto.

K	0.2423
Ks	10.685
a	0.3198
qmax	0.0098
μ_{max}	0.1828

5.1.3.4 Modelo de Grau

A continuación se presenta la misma secuencia de cálculo pero ahora aplicada al modelo de Grau para un reactor intermitente mezclado.

a) Ecuación seleccionada: $\theta_c = \frac{\ln \frac{S_0}{S}}{r_s}$

b) Ecuación de Grau: $\mu = \left(\frac{\mu_{max} \cdot S}{S} \right) - b ;$

c) Expresión resultante: $r_s = \mu_{max} \cdot M \cdot S / (Y \cdot S)$

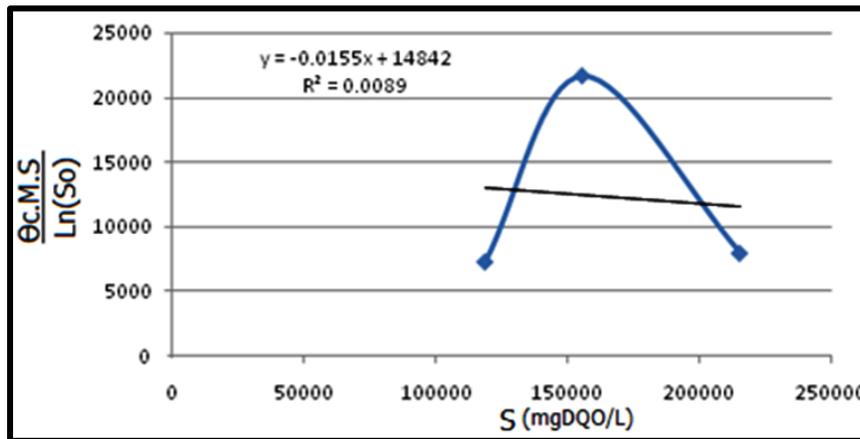
d) Expresión resultante: $\theta_c = Y(S) \cdot \ln(S) / (\mu_{max} \cdot M \cdot S)$

e) Resultado:

$$S = -K_s + q_{max} \cdot \left(\frac{M \cdot \theta_c \cdot S}{\ln(S_0)} \right) \dots \dots \dots \text{ec. [5-16]}$$

Como se puede ver, las constantes se determinan graficando $(M \cdot \theta_c \cdot S) / \ln(S_0)$ en las ordenadas contra S en las abscisas.

Figura 5.8 Determinación gráfica de las constantes cinéticas para el modelo Grau para el experimento



En la Tabla 5.5 se presentan los datos reportados a partir de la Figura 5.8 en donde la pendiente de la línea recta corresponde a q_{max} y su ordenada al origen corresponde a $-K_s$.

Tabla 5.5 Concentrado de los resultados de los parámetros cinéticos por el modelo de Grau

q_{max}	μ_{max}
0.0155	0.289179104

5.1.3.5 Modelo de Gompertz

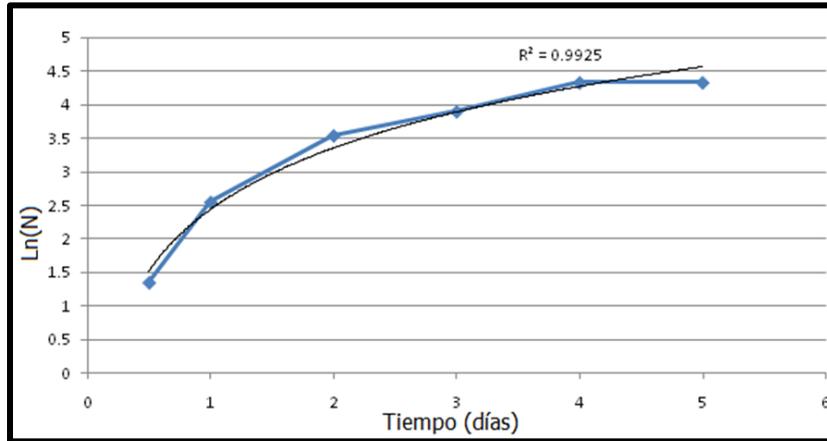
Para el modelo de Gompertz se utiliza una secuencia de cálculo diferente con respecto a los modelos anteriores. Se utiliza la ecuación modificada de Gompertz cuya expresión es:

$$\text{Log}(N) = A + C * e^{\{-e^{(-B*(t-M))}\}} \dots \text{ec. [5-17]}$$

En donde:

$\text{Log}(N)$ es el logaritmo decimal del número de microorganismos al tiempo t y T es el tiempo de retención hidráulico.

Figura 5.9 Determinación gráfica de las constantes cinéticas para el modelo Gompertz para el experimento.



La Tabla 5.6 presenta los parámetros cinéticos del Modelo de Gompertz a partir de la Figura 5.9.

En donde:

A es el valor asintótico cuando el tiempo decrece indefinidamente (aproximadamente equivalente al logaritmo decimal del número inicial de microorganismos).

C representa el incremento en el logaritmo del número de microorganismos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente o el logaritmo del número de ciclos de crecimiento.

B es la velocidad de crecimiento máximo relativo al tiempo M

M es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento.

Tabla 5.6 Concentrado de los resultados de los parámetros cinéticos por el modelo Gompertz

M	4
C	4.33474489
A	1.3487564
B	24.66604478

5.2 Resultados experimentales

La identificación de los gases se realizó por medio del tiempo de retención los cuales corresponden a 2.7 minutos para el hidrógeno, 5.3 minutos para el metano y 10.5 minutos para el dióxido de carbono. La cuantificación se realizó con 5 puntos de calibración para cada estándar de esta forma se obtiene las siguientes curvas de calibración:

Resultados obtenidos del cromatógrafo:

H_2 con una ecuación tal que:

$$Y = 2828.3x - 6226.4$$

$$R^2 = 0.9902.$$

CO_2 con una ecuación tal que:

$$Y = 113.77x - 237.81$$

$$R^2 = 0.9976.$$

CH_4 con una ecuación tal que:

$$Y = 711.12x - 713.67$$

$$R^2 = 0.9996.$$

Donde:

Y = área obtenida en el cromatograma

x= concentración en μ moles

Figura 5.10 Hidrógeno presente en los experimentos

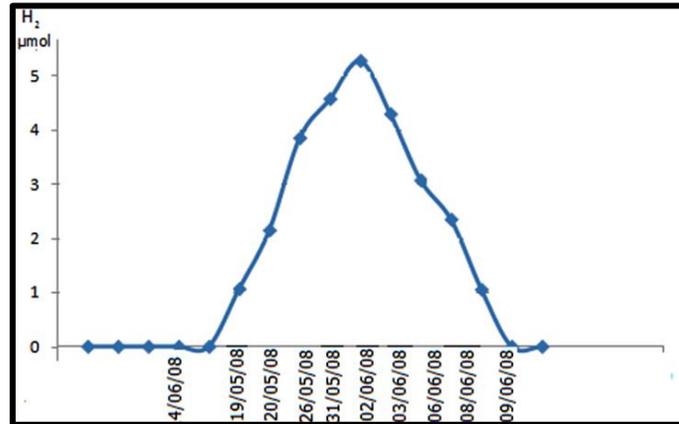


Figura 5.11 Metano presente en los experimentos

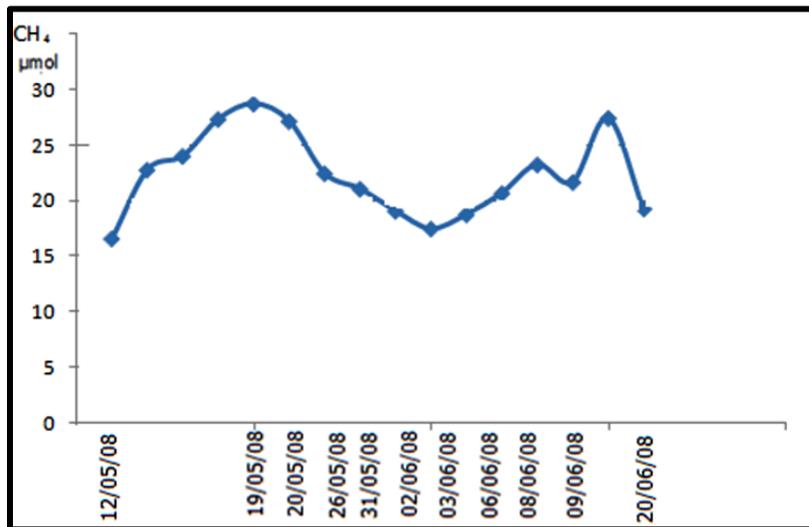
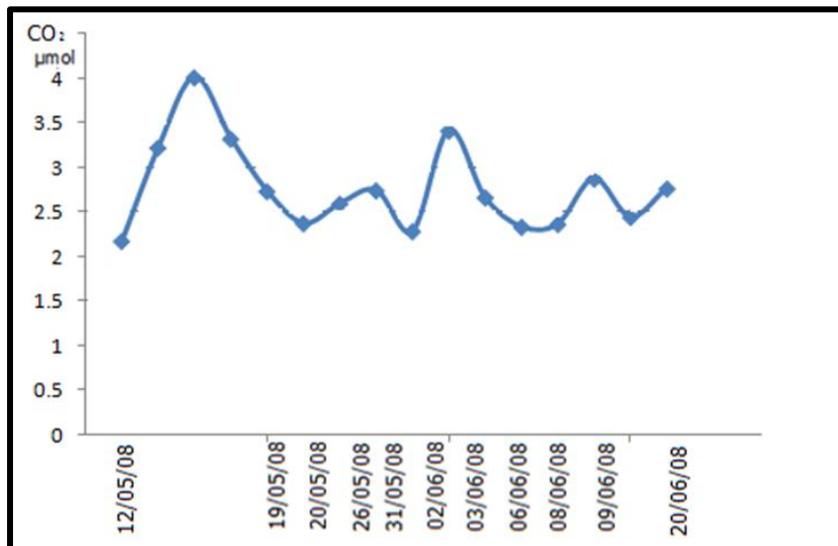


Figura 5.12 Dióxido de carbono presente en los experimentos



5.3 Análisis de resultados

A continuación se presenta una Tabla comparativa de las constantes cinéticas de los diferentes modelos cinéticos utilizados, con excepción del modelo de Gompertz que no puede compararse con los demás modelos ya que tiene constantes cinéticas muy diferentes.

Esta Tabla muestra que el modelo que más constantes cinéticas ofrece es el modelo de Contois, esto significa que la aplicación de nuestros resultados con este modelo nos aporta mas especificaciones y por lo tanto tiene mayor validez.

Además el coeficiente de correlación es muy cercano a uno lo que certifica que el modelo de Contois es el modelo más conveniente a utilizar entre los modelos presentados en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7 Resultados de los modelos utilizados en el experimento a excepción del modelo de Gompertz

MODELO	q_{max}	μ_{max}	Ks	Um	B	K	a	R ²
GRAU	0.0155	0.289179104	0.0089
MONOD	0.0054	0.10074626	-1669.7	0.9558
CONTOIS	0.0000069	0.000129	-33455.87	0.108	-44.53	-1.001	0.9913
CHEN HASHI.	0.0098	0.1828	10.685	0.2	0.319	0.0034

La Tabla 5.8 presenta los parámetros cinéticos del modelo de Gompertz en donde se puede observar que el coeficiente de correlación es de igual forma muy cercano a la uno.

Tabla 5.8 Concentrado de los resultados de los parámetros cinéticos por el modelo de Gompertz

MODELO	M	C	A	B	R ²
GOMPERTZ	4	4.33474489	1.3487564	24.66604478	0.9925

De los resultados anteriores se pudo verificar por el coeficiente de rendimiento de las bacterias Y, con un valor alto de 18.657, que se consume muy poco sustrato por las

bacterias. Por el otro lado el coeficiente de decaimiento de las bacterias b con un valor de 0.177238 por día, es un valor que al relacionarlo con el coeficiente de rendimiento indica que la tasa de mortalidad es prácticamente insignificante. El modelo que mejor se aplicó al de estas constantes fue el modelo de Contois junto con el de Gompertz dados sus valores de coeficientes de correlación.

Las constantes cinéticas de estos modelos indican que el tiempo de retención mínimo es de $7.7519 \text{ d}(1/\mu_{\text{max}})$ que se necesita para llevar a cabo el proceso de fermentación sin que haya un lavado de microorganismos y por consiguiente se mantenga el proceso de fermentación.

El valor de la constante de saturación (K_s) obtenida, indica el valor máximo de remoción al que se puede llegar. Se podría asumir que el tiempo de retención óptimo tendría que ser un tiempo mayor a 30 días.

Por otro lado, se observó que para una relación simple de rapidez de reacción y concentración de reactivo, el sistema apareció comportarse como una cinética de primer orden, es decir con una relación de rapidez de reacción directamente proporcional a la concentración de reactivo, materia orgánica. La constante de rapidez fue de 0.0467 dia^{-1} .

La Tabla 5.9 es una Tabla comparativa de los resultados obtenidos en el laboratorio con los resultados de otros autores anteriormente mencionados en este trabajo que aplicaron los mismos modelos cinéticos.

Tabla 5.9 Tabla comparativa de los parámetros cinéticos obtenidos con respecto a los resultados de otros autores.

MODELO		Éste Trabajo	Chen (2001)	Lyn (2003)	Lee (2004)
GRAU	q_{max}	0.0155	0.01344	0.02657	0.0347
	μ_{max}	0.289179	0.35915	0.4354	0.743
	R^2	0.0089	0.56	0.6437	0.7895
MONOD	q_{max}	0.0054	0.0067	0.00543	0.00783
	μ_{max}	0.1007462	0.1275	0.3467	0.834
	Ks	-1669.7	-1587.78	-1769.784	-1874.94
	R^2	0.9558	0.967	0.978	0.92435
CONTOIS	q_{max}	0.0000069	0.0000087	0.00000825	0.00000943
	μ_{max}	0.000129	0.000145	0.0002334	0.00072354
	Ks	-33455.87	-4578.56	-7923.72	-7923.254
	Um	0.1082	0.2456	0.7923	0.9824
	B	-44.53	-67.24	-83.27	-95.425
	a	-1.001	-1.098	-1.02734	-1.4355
	R^2	0.9913	0.9946	0.9783	0.995
CHEN Y HASHIMOTO	q_{max}	0.0098	0.015	0.0234	0.02435
	μ_{max}	0.1828	0.278	0.7236	0.42365
	Ks	10.685	11.78	23.342	35.3656
	a	0.3198	0.4679	0.672	0.7843
	K	0.242	0.67823	0.62336	0.4857
	R^2	0.0034	0.568	0.67824	0.4354

Tabla 5.10 Comparación de los parámetros cinéticos encontrados con el modelo Gompertz con respecto a otras investigaciones.

MODELO	Este Trabajo	Chen (2001)	Lyn (2003)	Lee (2004)
GOMPERTZ				
M	4	5	7	4
C	4.3347	6.87	8.34	9.345
A	1.3487	1.567	1.7893	1.365
B	24.6660	25.9834	26.89	32.346
R^2	0.9925	0.9578	0.975	0.9834

A partir de la Tabla 5.9 se puede constatar que los resultados de éste trabajo con respecto a los obtenidos de otros autores son similares en las variables de los diferentes métodos.

En la Tabla 5.10, de igual forma se comparo los resultados de las variables del modelo de Gompertz para éste trabajo y los resultados de otros autores usando el modelo de Gompertz y se constato una similitud en los resultados de sus parámetros cinéticos.

Conclusiones

Además de las dificultades en el arranque, y el control del proceso. Se requirió cuando fue necesario de pequeñas cantidades de bicarbonato para subir el pH al rango adecuado, a fin de iniciar el proceso en los días de fermentación. Se requirió de un estricto control en el pH y la alcalinidad vigilando constantemente la variabilidad de estos así como de la temperatura interna del reactor.

La determinación de las constantes cinéticas por medio de los modelos de fermentación analizados representó un reto, ya que el uso de estos implica la determinación de la cantidad de microorganismos en el sistema, la cual no siempre fue acertada y fue medida indirectamente con los valores de los sólidos suspendidos volátiles.

Lo anterior puede explicar en parte el coeficiente de utilización de sustrato (Y) mayor a la unidad encontrado (usualmente es mucho menor a la unidad), que indica que las bacterias consumen muy poco sustrato, es decir son altamente ineficientes. El coeficiente de decaimiento (b) tan bajo en comparación con Y , indica que la tasa de decaimiento de las bacterias es despreciable en comparación con la tasa de crecimiento.

En lo que se refiere a las constantes específicas (μ_{\max} y K_s), determinadas con los diferentes modelos cinéticos planteados, se concluyó que el modelo de Contois junto con el modelo de Gompertz fueron los que dieron resultados más congruentes.

La aplicabilidad de estas constantes con fines de diseño tendría un alto índice de riesgo, por lo que son modelos usados para escalas pequeñas.

Por otro lado, se observó que para una relación simple de rapidez de reacción y concentración de reactivo, el sistema pareció comportarse como una cinética de primer orden, es decir con una relación proporcional a la concentración de reactivo (materia orgánica).

Los resultados aquí presentados, fueron obtenidos con reactores convencionales de alimentación semicontinua y a temperatura controlada.

Referencias

- Abusam, A. 2002. Modelling the competition between sulphate reducers and methanogens in a thermophilic methanol-fed bioreactor. ***Water Sci. Technol.*** 45(10):93–98.
- Amao, Y. 2006. Biohydrogen production with the light-harvesting function of grana from spirulina and colloidal platinum. ***Int. J. Hydrogen Energy.*** 31:39–42.
- APHA. 1992. Standard methods: For the examination of water and wastewater.
- Blanch, H., Morrison, J. y Shales, S. 1997. Biochemical engineering. ***New York: Marcel Dekker***; 55:184–188.
- Bridgwater, C. 2006. Biomass for energy. ***J. Sci. Food. Agr.*** 86, 1755–1776.
- Brosseau, J. y Von Linde, F. 1982. Continuous microbial production of hydrogen gas. ***Int. J. Hydrogen Energy*** . 7:623–628.
- Brouwer, F. 2002. Identification of activated sludge and wastewater characteristics using respirometric batch-experiments. ***Water Res.*** 32(4):1240–1254.
- Castro-González, 2004. Digestión anaerobia de lodos residuales: Operación, control y cinética. Tesis de doctorado. Instituto de Química conjunto D, UNAM. México, D.F., México.
- Cech. C. 2003. Determination of kinetic constants of activated sludge microorganisms. ***Water Sci. Technol.*** 17, 259–272.
- Chang, S. 2002. Effects of volatile fatty acids to a thermophilic anaerobic hydrogen fermentation process degrading peptone. ***Water Sci. Technol.*** 46:202–217.

Chen, C., Lee, S., Park, J., Lee, C. y Yang, J. 2001. Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. ***Appl. Microbiol. Biotechnol.*** 57:56–64.

Chen, W., Chu, C. y Lee, D. 2005. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. ***Int. J. Hydrogen Energy.*** 30:1063–1070.

Chudoba, A. 1984. Determination of kinetic constants of activated sludge microorganisms. ***Water Sci. Technol.*** 17, 259–272.

Coleman, G. 2001. An interior, trust region approach for nonlinear minimization subject to bounds. ***SIAM J. Optim.*** 6, 418–445.

Das, D. 2001. Hydrogen production by biological processes: A survey of literature. ***Int. J. Hydrogen Energy.*** 26, 13–28.

Debabrata, D. 2001. Microorganisms production by hydrogen processes: A survey of literature. ***Int. J. Hydrogen Energy.*** 26, 13–28.

Duangmanee, T., Hirose, J. y Hayashi, S. 2002. Biohydrogen production in mixed culture anaerobic fermentation. In: Proceedings of the 14th world hydrogen energy conference. Québec, Canada.

Fabiano, B., Romera, E., Gonzalez, F. y Ballester, F. 2002. Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. ***Int. J. Hydrogen Energy.*** 27, 149–156.

Fang, H., Lin, C. y Chang, J. 2006. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. ***Int. J. Hydrogen Energy.*** 31:683–92.

Fletcher, P., William, F. 2004. Quasi-uniform Spaces. **Lindgren, New York, USA**. 65, 156-178.

Gaffron, H. 1999. Reduction of carbon dioxide with molecular hydrogen in green algae. **Nature**. 143, 204–205.

Gaffron, H. 1998 Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. **J. Gen. Physiol.** 26, 219–240.

Giraldo-Gomez, Goodwin. 2002. Influence of mass transfer limitations on determination of the half saturation constant for hydrogen uptake in a mixedculture CH₄-producing enrichment. **Biotechnol. Bioeng.** 40, 768–776.

Grau. C. 1984. Determination of kinetic constants of activated sludge microorganisms. **Water Sci. Technol.** 17, 259–272.

Gündüz, U. 2002. Aspects of the metabolism of bio-hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides. **Int. J. Hydrogen Energy**. 27, 1315–29.

Hallenbeck, P., Castle, W. y Davies, F. 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. **Int. J. Hydrogen Energy**. 27, 1185.

Hawkes, F. 2002. Sustainable fermentative biohydrogen: Challenges for process optimization. **Int. J. Hydrogen Energy**, 27:1339–1347.

Heyndrickx, M., Eroglu, I. Gündüz, U. y Yücel, M. 1987. Effect of various external factors on the fermentative production of hydrogen gas from glucose by Clostridium butyricum strains in batch culture. **System. Appl. Microbiol.** 9, 163–168.

Hirano, A., De Vos, P. y Thibau, B. 1998. Temperature effect on continuous gasification of microalgal biomass: Theoretical yield of methanol production and its energy balance. *Catal. Today*. 45, 399–404.

Horiuchi, J., Shao, P., Lu, T. y Shen, J. 2002. Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control. *Bioresource Technol.* 82, 209–213.

Hu, H. 1991. Kinetic study of hybridoma cell growth in continuous culture. I. A model for nonproducing cells. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 555–564.

Hulshoff, P. 2000. Thermophilic sulphate reduction and methanogenesis with methanol in a high rate anaerobic reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 67 (3), 354–363.

Jongenburger, I. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881.

Kapdan, I., Velterop, J. y Vos, F. 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microbial Technol.* 38, 569–582.

Kargi, F. 2006. Bio-resource study from natural materials. *Enzyme Microbial Technol.* 38, 234–272.

Kaushik, N. 2005. En su artículo Kinetics of two-stage fermentation process for the production of hydrogen. *Biotechnol. Bioeng.* 93(5):934–946.

Khanal, S., Monga, P., Biswas, A. y Das, D. 2004. Biological hydrogen production: Effects of pH and intermediate products. *Int. J. Hydrogen Energy.* 29(11), 1123–31.

Kidby, D., Chen, W., Li, L. y Sung, S. 1991. An investigation into suitability of biogas biohydrogen concentration as performance monitor for anaerobic sewage sludge digesters. *Water Res.* 25, 1007–1012.

Kim, MS., Hirose, J. y Hayashi, S. 2001. Hydrogen production from food processing wastewater and sewage sludge by anaerobic dark fermentation combined with photofermentation. En: Miyake, J., Igarashi, Y., Rogner, M., editorial. Biohydrogen II. Amsterdam: **Elsevier**. 263–272.

Kim, M., Maki, R., Hirose, J. y Hayashi, S. 2006. Comparison of H₂ accumulation by Rhodobacter sphaeroides KD131 and its uptake hydrogenase and PHB synthase deficient mutant. **Int. J. Hydrogen Energy**. 31, 121–127.

Koku, H., Nishihara, A., Ueda, C. y Ohtsuki, M. 2003. Kinetics of biological hydrogen production by the photosynthetic bacterium Rhodobacter sphaeroides O.U 001. **Int. J. Hydrogen Energy**. 28, 381–388.

Kokua, H., Ho, J. y Khanal, S. 2006. Aspects of the metabolism of bio-hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides. **Int. J. Hydrogen Energy**. 27, 1315–1329.

Kovarova, A. 2002. Temperature dependent growth kinetics of Escherichia coli ML 30 in glucose-limited continuous culture. **J. Bacteriol**. 178, 4530–4539.

Kumar, N., Jae, H., Hee, G. y Oh, J. 2000a. Enhancement of hydrogen production by Enterobacter cloacae IIT-BT 08. **Proc. Biochem**. 35, 589–593.

Kumar, N., Nishihara, A., Ueda, C. y Ohtsuki, C. 2000b. Modeling and simulation of clean fuel production by Enterobacter cloacae IIT-BT 08. **Int. J. Hydrogen Energy**. 25, 945–952.

Kumar, N., Sawayama, S., Inoue, S. y Dote, Y. 2001. Continuous hydrogen production by immobilized Enterobacter cloacae IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices. **Enz. and Microb. Technol**. 29, 280–287.

Lay, J., Jae, H., Hee, G., Oh, J. y Young, M. 1997. Influences of pH and moisture content on the methane production in high solids sludge digestion. **Water Res**. 3, 1518–1524.

Lay, J., Liu, H. y Zhang, T. 2000. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. ***Biotechnol. Bioeng.*** 68(3), 269–278.

Lay, J. 2000. Model and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. ***Biotechnol. Bioeng.*** 68(3), 269–278.

Lay, J. 2001. Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. ***Biotechnol. Bioeng.*** 74, 280–287.

Lee, C., Li, C. y Ho, J. 2002. Photohydrogen production using purple non-sulfur bacteria with hydrogen fermentation reactor effluent. ***Int. J. Hydrogen Energy.*** 27, 1308–1314.

Lee, K., Miyahara, T. y Noike, T. 2004a. Anaerobic hydrogen production with an efficient carrier-induced granular sludge bed bioreactor. ***Biotechnol. Bioeng.*** 87(5), 648–657.

Lee, K. y Shen, J. 2004b. Operation strategies for biohydrogen production with a high-rate anaerobic granular sludge bed bioreactor. ***Enzyme Microb. Technol.*** 35(6–7), 605–612.

Lee, Y., Kawai, T., Sato, S., Otsuka, S. y Morimoto, M. 2001. Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. ***Bioresource Technol.*** 80, 227–231.

Li, C., Yang, Y. y Feng, C.P. 2003. Temperature-phased anaerobic digestion (TPAD) of food waste together with waxcoated cardboard. ***Proceedings of the Asian water quality.*** 76, 234-265.

Li, L. 2004. Biological hydrogen production: Effects of pH and intermediate products. ***Int. J. Hydrogen Energy.*** 29(11), 1123–1131.

Lin, C., Eroglu, I. y Gündüz, U. 1999. Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. ***J. Chem. Technol. Biotechnol.*** 74, 498–500.

Lin, C., Wu, J., Lo, Y. y Lo, Y. 2003. Hydrogen production from sucrose using an anaerobic sequencing batch reactor process. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 78, 678–684.

Lin, C. 2001. Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 57, 56–64.

Lin, P. 2006. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. **Int. J. Hydrogen Energy.** 31(4), 465–472.

Liu, G. y Shen, J. 2004. Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. **J. Biosci. Bioeng.** 98(4), 251–256.

Liu, H., Sawayama, S., Inoue, S. y Dote, A. 2003. Thermophilic H₂ production from a cellulose-containing wastewater. **Biotech. Lett.** 23, 365–369.

Liu, H. 2002. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. **Bioresource Technol.** 82, 87–93.

Lo, Y. 2006. Improving biohydrogen production in a carrier-induced granular sludge bed by altering physical configuration and agitation pattern of the bioreactor. **Int. J. Hydrogen Energy.** 31(12), 1648–1657.

Lo, Y. 2004. Operation strategies for biohydrogen production with a high-rate anaerobic granular sludge bed bioreactor. **Enzyme Microb. Technol.** 35(6–7), 605–612.

Lui, Y. 1996. Bioenergetic interpretation on S₀/X₀ ratio in substrate-sufficient batch culture. **Water Res.** 30, 2766–2770.

Majizat, A., Baek, J. y Lee, J. 1997. Hydrogen gas production from glucose and its microbial kinetics in anaerobic systems. **Water Sci. Technol.** 36-37.

Melis, A. 2004. Trails of green alga hydrogen research—from Hans Gaffron to new frontiers. ***Photosynthesis Res.*** 80, 401–409.

Morimoto, M. 1992. Efficient bio-hydrogen production from starch by a bacterium isolated from termites. ***J. Ferment. Technol.*** 73, 244–245.

Nath, K., Rao, P., Vijaya, Y. y Reddy, G. 2005. Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* strain O.U 001 using spent media of *Enterobacter cloacae* DM11. ***Appl. Microbiol. Biotechnol.*** 68, 533–541.

Nath, K. 2004. Improvement of fermentative hydrogen production: Various approaches. ***Appl. Microbiol. Biotechnol.*** 65, 520–529.

Oh, Y., Hunt, P. y Humenik, F. 2003. Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp.Y19. ***Int. J. Hydrogen Energy.*** 28, 1353–1359.

Oh, Y., Kim, Y., Wu, X., Berzin, I. y Merchuk, M. 2002. Fermentative hydrogen production by a new chemolithotrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. ***Int. J. Hydrogen Energy.*** 27, 1373–1379.

Oh, Y., Liang, T., Cheng, S. y Wu, V. 2004. Photoproduction of hydrogen from acetate by a chemoheterotrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* P4. ***Int. J. Hydrogen Energy.*** 29,1115–1121.

Okamoto, M., Chang, B. y Liao, C. 2000. Biological hydrogen potential of materials characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes. ***Water Sci. Technol.*** 41, 25–32.

Owen, W. y Von Linde, F. 1999. Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. ***Water Res.*** 13, 485–493.

Pavlostathis, O. 2001. Kinetics of anaerobic treatment: A critical review. ***Critical Rev. Environ. Control.*** 21, 411–490

Penya-Roja, A. 2002. Calibration and validation of Activated Sludge Model No.2d for Spanish municipal wastewater. ***Environ. Technol.*** 23 (8), 849–862.

Rao, K. 2001. Producing hydrogen as fuel. In: Cammack R, Frey M, Robson R, editors. ***Hydrogen as fuel learning from nature.*** 201–229.

Ribes, J. 2003. Modelling biomass growth kinetics with a substrate threshold concentration: Department of Agrotechnology and Food Sciences, Wageningen University, The Netherlands. ***Technical Systems & Control Report.*** 230-257.

Rocha, J., Chen, W. y Li, L. 2001. Hydrogen production by photosynthetic bacteria: Culture media, yields and efficiencies. ***Elsevier.*** 33–32.

Rombouts, F. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. ***Appl. Environ. Microbiol.*** 56, 1875–1881.

Roychowdhury, S., Sato, S., Otsuka, S. y Morimoto, M. 1988. Production of hydrogen by microbial fermentation. ***Int. J. Hydrogen Energy.*** 13, 407–410.

Saito-Taki, T. 1995. Bio-hydrogen production from continuous fermentation of xylose during growth of Clostridium. ***Can. J. Microbiol.*** 41, 536–540.

Shen, J. 2004. Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. ***J. Biosci. Bioeng.*** 98(4), 251–256.

Sims-Ralph, E. 2004. Bioenergy options for a cleaner environment. ***Elsevier.*** 1-28.

Soler, L. 2006. Electrocatalytic production of hydrogen boosted by organic pollutants and visible light. ***Int. J. Hydrogen Energy***. 31, 129–139.

Spanjers, N. 2002. Modelling the competition between sulphate reducers and methanogens in a thermophilic methanol-fed bioreactor. ***Water Sci. Technol.*** 45 (10), 93–98.

Stoll, R. 2000. Hydrogen—what are the costs?. ***Hydrocarbon Process*** . 79, 42–46.

Sung, S. 2004. Biological hydrogen production: Effects of pH and intermediate products. ***Int. J. Hydrogen Energy***. 29(11), 1123–1131.

Taguchi, F., Mitsunori, Y., Mitsunori, W. y Michimasa, N. 2003. Efficient bio-hydrogen production from starch by a bacterium isolated from termites. ***J. Ferment. Technol.*** 73, 244–245.

Taguchi, F., Shimizu, T., Tada, K. y Kanno, T. 1995. Bio-hydrogen production from continuous fermentation of xylose during growth of *Clostridium* sp. ***Can. J. Microbiol.*** 41, 536–540.

Tros, F. 2003. Measurement of minimum substrate concentration (S_{min}) in a recycling fermentor and its prediction from the kinetic parameters of *Pseudomonas* sp. strain B13 from batch and chemostat cultures. ***Appl. Environ. Microbiol.*** 62, 3655–3661.

Tseng, Z. 2005. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. ***Int. J. Hydrogen Energy***. 30(10), 1063–1070.

Ueno, Y., Monga, P. y Biawas, A. 1995. Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora. ***J. Ferm. Bioeng.*** 79, 395–397.

Van Ginkel, S., Seol, E. y Kim, J. 2001. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. ***Environ. Sci. Technol.*** 35, 4726–4730.

Van Groenestijn, J., Sealock J., Baker, E. y Elliott, D. 2002. Energy aspects of biological hydrogen production in high rate bioreactors operated in the thermophilic temperature range. ***Int. J. Hydrogen Energy***. 27, 1141–1147.

Van Niel. y Ed, W. 2003. Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. ***Biotech. Bioeng.*** 81(3), 255–260.

Veziroglu, N., Pieterneel, A., Classen, A. y Stams, J. 2001. Hydrogen production by biological processes: A survey of literature. ***Int. J. Hydrogen Energy***. 26, 13–28.

Wakayama, T. 2001. Hydrogen from biomass. ***Elsevier Science***. 41–45.

Wang, C., Liu, H. y Zhang, T. 2003a. Using filtrate of waste biosolids to effectively produce bio-hydrogen by anaerobic fermentation. ***Water Res*** . 37, 2789–2793.

Wang, C. y Nakanuta, N. 2003b. Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. ***J. Biotechnol.*** 102, 83–92.

Wang, D., Mizuno, O. y Noike, T. 2004. Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. ***J. Inst. Brewing***. 110, 340–346.

Weijma, B. 2000. Thermophilic sulphate reduction and methanogenesis with methanol in a high rate anaerobic reactor. ***Biotechnol. Bioeng.*** 67 (3), 354–363.

Wen-Hsing, J. y Chen, W. 2006. Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. ***Elsevier, International journal of hydrogen energy***. 2170 – 2178.

Werker, A. 2000. The effect of pH on microbial activity and community structure in the biological removal of resin acids from wastewater. Ph.D. Thesis, University of British Columbia, Canada.

Woodward, J. y Nedwell, D. 2000. Enzymatic hydrogen production: Conversion of renewable resources for energy production. ***Energy Fuel***. 14, 197–201.

Wu, S. y Lin, C. 2006. Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge. ***Biotechnol. Bioeng.*** 93(5), 934–946.

Yang, H., Lee, K. y Lin, P. 2006. Continuous bio-hydrogen production from citric acid wastewater via facultative anaerobic bacteria. ***Int. J. Hydrogen Energy***. 31, 1306–1313.

Yokoi, H., Hung, CH., Lin, C. y Chen, W. 2002. Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes. ***Biomass Bioenergy***. 22, 389–395.

Yu, H. y Lay, J. 2002. Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. ***Int. J. Hydrogen Energy***. 27, 1359–1365.

Zhang, T., Eroglu, I., Günduz, U. y Yucel, M. 2003. Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition. ***J. Environ. Manage.*** 69, 149–156.

Zhang, T. 2006. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. ***Int. J. Hydrogen Energy***. 31, 683–692.