



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Producción de bio- hidrógeno a partir de suero de leche y otros
residuos en un reactor anaerobio de lecho fluidizado y
fotobiorreactores**

Tesis que presenta

M. en C. Karla María Muñoz Páez

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de la Tesis: **Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo**
Dr. Jaime García Mena

México, D.F.

Enero 2015

Para el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante la beca No. 203637 y el financiamiento parcial del CINVESTAV

Agradecimientos

En este apartado se agradece y reconoce el apoyo y la amistad recibidas por las personas que ayudaron a hacer posible este trabajo:

Al personal del laboratorio de Biotecnología Ambiental:

M. en C. Rafael Hernández Vera por el apoyo brindado en el asesoramiento y adiestramiento de las técnicas utilizadas para el seguimiento de los reactores anaerobios de lecho fluidizado.

Ing. Teresa Sánchez y **Lic. David Portilla** por el adiestramiento en los procedimientos de prevención de accidentes en laboratorio.

Al personal del laboratorio de Química Analítica:

A la **Maestra Elvira Ríos Leal**, al **Ing. Q. Cirino Rojas**, al **C. Gustavo Medina** por su ayuda en las técnicas de cromatografía de gases (TCD y FID) y líquidos (HPLC).

Al personal del laboratorio del laboratorio de Referencia y Apoyo para Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas del Departamento de Biología Molecular y Genética Microbiana:

Biol. Alberto Piña Escobedo, la **Bio. Carolina Miranda Brito** y **M. en C. S. Murugesan** por su apoyo y asesoría en las técnicas de biología molecular para la identificación de microorganismos.

Lic. José Rodrigo García Gutiérrez por su apoyo en el manejo de los equipos del laboratorio.

Dedicatoria

Deseo dedicar este trabajo a las personas que me han acompañado y fortalecido durante la realización de este trabajo.

Principalmente a mi familia: Carlos Muñoz Cabello, Enedina Paéz Reyes y Alma Angélica Muñoz Páez.

Y a mis amigos de diversos tiempos, con los que compartí buenos y malos tiempos durante la realización de este proyecto.

Comité Tutorial

Dra. Josefina Barrera Cortés, Asesora
Depto. Biotecnología y Bioingeniería



Dr. Jaime García Mena, Co-Director
Depto. Genética y Biología Molecular



Prof. Héctor Mario Poggi- Varaldo, Co-Director
Depto. Biotecnología y Bioingeniería



Dra. María Teresa Ponce Noyola, Asesora
Depto. Biotecnología y Bioingeniería



Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia, Asesora
Depto. Biotecnología y Bioingeniería



Dra. Ileri Robles González, Asesora
NovaUniversitas



Dra. Nora Ruiz Ordáz, Asesora
ENCB



Dra. Ma de Lourdes Villa Tanaca, Asesora extraordinaria
ENCB



M. en C Noemí Rinderknecht-Seijas, Asesora extraordinaria
ESIQIE

Índice	Pág.	
1	Introducción.....	1
1.1	Combustibles fósiles	1
1.2	Energías renovables	1
1.2.1	Biomasa.....	1
1.3	Hidrógeno como combustible.....	2
1.3.1	Proceso fotosintético: Biofotólisis	3
1.3.2	Reacción biológica de intercambio gaseoso (biological water gas shift reaction)	3
1.4	Producción fermentativa de hidrógeno.....	4
1.4.1	Fermentación oscura	4
1.5	Fotofermentación	11
1.5.1	Bacterias púrpura no del azufre.....	12
1.5.2	Nitrogenasa	13
1.5.3	Hidrogenasa	13
1.5.4	Inhibición por NH_4^+	14
1.6	Procesos de producción de H_2 de dos etapas	14
1.7	Caracterización de la comunidad microbiana.....	16
1.7.1	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante	17
1.7.2	Secuenciamiento masivo de una genoteca de 16S rDNA	17
1.7.3	Diversidad alfa, beta y gamma	18
2	Justificación.....	19
3	Alcance	20
4	Hipótesis	21
4.1	Hipótesis General.....	21
4.2	Hipótesis Particulares.....	21
5	Objetivos	22
5.1	General	22
5.2	Particulares	22
6	Metodología	23
6.1	Estrategia experimental.....	23
6.2	Actividad 1. Estudios preliminares del potencial hidrogenogénico del suero de leche en fermentación anaerobia.....	24
6.2.1	Actividad 1.1 Arranque y operación de reactores anaerobios metanogénicos (DAM).....	24
6.2.2	Actividad 1.2 Arranque y operación reactores anaerobios de lecho fluidizado (RLF).....	26
6.3	Actividad 2. Superación de la inhibición de la producción de H_2	30
6.3.1	Propósito	30
6.3.2	Diseño experimental y equipamiento del experimento	30
6.3.3	Seguimiento y análisis	30
6.3.4	Métodos analíticos y procedimientos.....	30
6.4	Actividad 3. Producción de H_2 en lote utilizando suero de leche como sustrato.....	31

6.4.1	Actividad 3.1. Estudios presuntivos de producción de H ₂ en lote utilizando suero de leche como sustrato	31
6.4.2	Actividad 3.2. Producción de H ₂ en lote utilizando suero de leche como sustrato.....	33
6.5	Actividad 4. Estudio de la comunidad microbiana en los experimentos de fermentación oscura	35
6.5.1	Propósito	35
6.5.2	Seguimiento y análisis	35
6.5.3	Métodos analíticos y procedimientos.....	35
6.5.4	Índices de riqueza y uniformidad	43
6.6	Actividad 5. Estudios del potencial hidrogenogénico fotoheterotrófico de los licores fermentados.....	47
6.6.1	Propósito	47
6.6.2	Diseño experimental y equipamiento del experimento	47
6.6.3	Seguimiento y análisis	47
6.6.4	Métodos analíticos y procedimientos.....	48
6.7	Actividad 6. Evaluación de la producción de H ₂ a partir de la fermentación oscura de la mezcla de sustratos (SL-FORSU) en FASSH-VI.....	49
7	Resultados	51
7.1	Actividad 1. Estudios preliminares del potencial hidrogenogénico del suero de leche en fermentación anaerobia.....	51
7.1.1	Actividad 1.1 Arranque y operación de reactores anaerobios metanogénicos (DAM).....	51
7.1.2	Actividad 1.2 Arranque y operación reactores anaerobios de lecho fluidizado (RLF).....	53
7.2	Actividad 2. Superación de la inhibición de la producción de H ₂	59
7.3	Actividad 3. Producción de H ₂ en lote utilizando suero de leche como sustrato	62
7.3.1	Actividad 3.1. Estudios presuntivos de producción de H ₂ en lote utilizando suero de leche como sustrato	62
7.3.2	Actividad 3.2. Producción de H ₂ en lote utilizando suero de leche como sustrato.....	67
7.4	Comparación con otras investigaciones de producción de H ₂ utilizando suero de leche como sustrato.....	73
7.5	Actividad 4. Estudio de la comunidad microbiana en los experimentos de fermentación oscura	74
7.6	Actividad 5. Estudios del potencial hidrogenogénico fotoheterotrófico de los licores fermentados (para detectar inhibición de N-3).....	81
7.7	Evaluación de la producción de H ₂ a partir de la fermentación oscura de la mezcla de sustratos (SL-FORSU) en FASSH-VI	85
8	Conclusión	87
8.1	Actividad 1. Estudios preliminares del potencial hidrogenogénico del suero de leche en fermentación anaerobia.....	87
8.2	Actividad 2. Superación de la inhibición de la producción de H ₂	87
8.3	Actividad 3. Producción de H ₂ en lote utilizando suero de leche como sustrato	87

8.4	Actividad 4. Estudio de la comunidad microbiana en los experimentos de fermentación oscura	88
8.5	Actividad 5. Estudios del potencial hidrogenogénico fotoheterotrófico de los licores fermentados	88
8.6	Actividad 6. Evaluación de la producción de H ₂ a partir de la fermentación oscura de la mezcla de sustratos (SL-FORSU) en FASSH-VI.....	88
9	Referencias	90
10	ANEXO . Artículos publicados.....	99

Índice de Tablas

Tabla 1. Composición del suero de leche	7
Tabla 2. Ventajas y desventajas de los procesos biológicos de producción biológica de H ₂	15
Tabla 3. Programa de seguimiento y análisis DAM	24
Tabla 4. Solución de alimentación DAM	25
Tabla 5. Programa de seguimiento y análisis de los reactores de lecho fluidizado	27
Tabla 6. Medio mineral	28
Tabla 7. Composición del agua residual sintética	29
Tabla 8. Características del suero de leche en polvo *	29
Tabla 9. Diseño experimental	31
Tabla 10. Programa de seguimiento y análisis experimentos en lote	32
Tabla 11. Niveles de las variables independientes en términos de unidades codificadas y naturales	33
Tabla 12. Composición de la reacción de PCR eubacterias.	37
Tabla 13. Programa de reacción de PCR para eubacterias	37
Tabla 14. Reacción de ligación.	40
Tabla 15. Composición de la reacción de PCR confirmatoria	42
Tabla 16. Programa de reacción de PCR confirmatoria	42
Tabla 17. Programa de reacción de PCR confirmatoria	43
Tabla 18. Programa de seguimiento y análisis de producción fotoheterótrofa de H ₂	47
Tabla 19. Programa de seguimiento y análisis experimentos de co-fermentación SL-FORSU	49
Tabla 20. Programa de seguimiento y análisis de co-fermentación de sustratos ...	49
Tabla 21. Productos microbianos solubles generados en RLF-A y RLF-M	54
Tabla 22. Desempeño promedio de los RLF-A y RLF-M con 10 g/L _{lecho} *día de sacarosa y de suero de leche	56
Tabla 23. Productos microbianos solubles de RLF-A y RLF-M con 10 g/L _{lecho} *día de sacarosa y de suero de leche	57
Tabla 24. Desempeño promedio de los RLF-A y RLF-M con 10 y 5 g/L _{lecho} *día de suero de leche y NaCl	61
Tabla 25. Producción acumulada de H ₂ , velocidad inicial de producción y tiempo de retardo de la producción de H ₂ experimento presuntivo 1	63
Tabla 26. Producción acumulada de H ₂ , velocidad inicial de producción y tiempo de retardo de la producción de H ₂ experimento presuntivo 2	64
Tabla 27. Concentración de ácidos y solventes de la producción del presuntivo	265
Tabla 28. Producción acumulada de H ₂ , relación ρ y relación A/B a 35° C y temperatura ambiente	68
Tabla 29. Análisis de varianza del experimento 2 ³ , factores: temperatura, concentración de sustrato y pH inicial	69
Tabla 30. Probabilidades significativas de ANOVAs de las variables de respuesta para las superficies de respuesta	70
Tabla 31. Ecuaciones finales en términos de factores actuales	70
Tabla 32. Producción de H ₂ utilizando suero de leche como sustrato	73

Tabla 33. Índices de similaridad de Jaccard, índice de divergencia de Poggi, y coeficiente dinámico de divergencia	75
Tabla 34. Perfil de microorganismos detectados en el secuenciamiento masivo en las distintas etapas de operación del RLF-A.....	78
Tabla 35. Índice de Shannon-Weaver en las distintas etapas de operación	80
Tabla 36. Índice de Pielou en las distintas etapas de operación del RLF-A.....	80
Tabla 37. Producción acumulada de H ₂ , pH SST y SSVde los experimentos de fotoheterotrofia de licores fermentados.....	82
Tabla 38. Productos microbianos solubles generados en la fermentación foroheterótrofa de licores fermentados.....	84
Tabla 39. Producción acumulada de H ₂	86
Tabla 40. Productos microbianos solubles generados en la fermentación de la mezcla de sustratos SL-FORSU	86

Índice de Figuras

Figura 1. Producción, importación, exportación y consumo de la leche en el 2013 (http://www.canilec.org.mx/importaciones.html)	6
Figura 2. Esquema general de la hidrogenogénesis fotoheterótrofa (Adaptado de Koku <i>et al.</i> , 2002)	12
Figura 3. Plan de trabajo. SL: suero de leche; FORSU: fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos; FASSH-VI: fermentación anaerobia en sustrato sólido con venteo intermitente.....	23
Figura 4. Esquema del reactor de lecho fluidizado.....	26
Figura 5. Etapas RLF. ARS: agua residual sintética; SL: suero de leche.....	28
Figura 6. Protocolo de identificación de microorganismos por la técnica de DGGE para el seguimiento de comunidades microbianas	36
Figura 7. Vector de clonación pJET 1.2	39
Figura 8. Seguimiento del desempeño de reactores anaerobios metanogénicos: a) rendimiento de producción de biogás; b) concentración de metano en el biogás; c) concentración de sólidos totales; d) eficiencia de remoción de DQO; e) pH y f) parámetro alfa. \diamond DAM1 y \square DAM2	52
Figura 9. Dinámicas de: (a) concentración de H ₂ en el biogás; (b) concentración de CH ₄ en el biogás; (c) pH; y (d) productividad de H ₂ . \square : RLF-A; Δ : RLF-M. Notas: líneas punteadas indican el cambio de Bv=5 g sacarosa/L _{lecho} *día a 8 g sacarosa/L _{lecho} *día.....	53
Figura 10. Dinámicas del RLF-A: (a) concentración de H ₂ en el biogás; (b) productividad de H ₂ ; (c) pH. Nota: líneas punteadas indica cambio a una Bv= 5 g/L _{lecho} *día de SL.....	60
Figura 11. Producción de H ₂ en reactores en lote utilizando suero de leche como sustrato. \diamond ambiente; \blacktriangle 35°C. Línea punteada indica el momento del gaseado con N ₂	62
Figura 12. Superficie de respuesta a 35° C: (a) producción acumulada de H ₂ , (b) relación ρ , (c) relación A/B.....	71
Figura 13. Superficie de respuesta a temperatura ambiente: (a) producción acumulada de H ₂ , (b) relación ρ , (c) relación A/B.....	72
Figura 14. Gel de DGGE de las diferentes etapas de operación del RLF-A. S: 10 g/L _{lecho} *día de sacarosa; SL: 10 g/L _{lecho} *día suero de leche; SL-1tt: 10 g/L _{lecho} *día de suero de leche y primer tratamiento térmico; SL-2tt: 10 g/L _{lecho} *día suero de leche y el segundo tratamiento térmico; y SL-NaCl-2: 10 g/L _{lecho} *día de SL y NaCl.	74
Figura 15. Gel de DGGE preparativo de la muestra del reactor de lecho fluidizado operado a temperatura ambiente alimentado con suero de leche (10 g/L _{lecho} *día) con NaCl.	74
Figura 16. Abundancia relativa de los phyla de cada etapa de producción de H ₂ . S: 10 g/L _{lecho} *día de sacarosa; SL: 10 g/L _{lecho} *día suero de leche; SL-1tt: 10 g/L _{lecho} *día de suero de leche y primer tratamiento térmico; SL-2tt: 10 g/L _{lecho} *día suero de leche y el segundo tratamiento térmico; y SL-NaCl-2: 10 g/L _{lecho} *día de SL y NaCl.	76
Figura 17. Curvas de rarefacción. S: 10 g/L _{lecho} *día de sacarosa; SL: 10 g/L _{lecho} *día suero de leche; SL-1tt: 10 g/L _{lecho} *día de suero de leche y primer tratamiento	

térmico; SL-2tt: 10 g/L _{lecho} *día suero de leche y el segundo tratamiento térmico; y SL-NaCl-2: 10 g/L _{lecho} *día de SL y NaCl.....	77
Figura 18. Producción fotoheterótrofa de H ₂ . a) <i>Rhodopseudomonas palustris</i> y b) Cultivo mixto. ◇ LF directo; △ dilución 1:2 del LF; □ Medio Pfenning. Líneas punteadas indican gaseado con argón.	81
Figura 19. Producción acumulada de H ₂ en FASSH-VI con co-fermentación de sustrato SL-FORSU. ○ 100/0 □ 70/30; ◆ 50/50; ■ 30/70 y ● 0/100. Las líneas punteadas indican el gaseado con N ₂ y re-incubación.....	85

Notación

A/B: relación de la concentración de ácido acético/ concentración de ácido butírico

BuOH: butanol

BPNS: bacterias púrpura no del azufre

Bv: carga orgánica volumétrica

DGGE: electroforesis en gel con gradiente desnaturizante

DQO: demanda química de oxígeno

EtOH: etanol

FORSU: fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos

TRH: tiempo de retención hidráulico

HAc: concentración de ácido acético

HBu: concentración de ácido butírico

HLac: concentración de ácido láctico

HPr: concentración de ácido propiónico

LF: licor fermentado

NmL: volumen en mililitros, normalizados a 273 K y 101.325 kPa

PMS: productos microbianos solubles

RLF: reactor de lecho fluidizado

SL: suero de leche

AOVT: ácidos orgánicos volátiles totales

Caracteres griegos

ρ : relación de la suma de la concentración de ácidos orgánicos volátiles / suma de solventes

Resumen

Se llevó a cabo la producción de H_2 utilizando suero de leche como sustrato en un proceso biológico en dos etapas (fermentación oscura- foto fermentación). La fermentación oscura se llevó a cabo en un reactor de lecho fluidizado y la foto-fermentación en fermentación en lote.

La metodología se dividió en 4 grandes fases: 1. Fermentación oscura sumergida; 2. Caracterización de comunidades microbianas; 3. Fermentación foto-heterótrofa; y 4. Fermentación oscura en estado sólido con mezcla de sustratos.

Se validó la hipótesis general del proyecto refiriéndose a que “el proceso de fermentación oscura acoplada con foto-fermentación utilizando suero de leche como sustrato, incrementará en al menos 50% la producción de hidrógeno comparada con solo la fermentación oscura”. Obteniendo dos veces mayor producción de H_2 en el sistema acoplado comparado con solo la fermentación oscura.

En los experimentos de fermentación en lote, la producción acumulada de H_2 a temperatura ambiente fue de aproximadamente el doble de la obtenida a $35^\circ C$, validando la hipótesis particular 1: “La producción de H_2 a temperatura ambiente será similar e incluso mayor que a $35^\circ C$, en fermentación en lote”.

Con la mezcla de sustratos suero de leche-FORSU (50/50) se obtuvo 1.5 veces mayor producción acumulada de H_2 que solo con FORSU, validando así la hipótesis particular 2: “En la fermentación oscura en estado sólido, el suero de leche en co-fermentación con la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) tendrá mayor producción de H_2 que solo el uso de FORSU como sustrato.

Palabras clave: fermentación oscura, fermentación fotoheterótrofa, hidrógeno, reactor de lecho fluidizado, suero de leche.

Abstract

The main objective of this work was to produce H₂ using cheese whey as substrate in a two stages biological process (dark fermentation- photoheterotrophic fermentation). The dark fermentation was carried out in fluidized bed bioreactors, and the photofermentation in batch mode.

The methodology was conformed of four phases: 1. Submerged dark fermentation; 2. Microbial communities characterization; 3. Photoheterotrophic fermentation; and 4. Solid substrate dark fermentation.

The main hypothesis was validated: "The two stage process using cheese whey as substrate will increase the H₂ production by 50% compared with the dark fermentation alone". In this work, was observed two fold higher H₂ productions with the two stage process than with the dark fermentation alone.

In the batch dark fermentation, the cumulative H₂ production at ambient temperature was two fold of that obtained at 35°C; with this value, the particular hypothesis 1 was validated: "The H₂ production at ambient temperature will be close or even higher than at 35°C, in batch fermentation".

It was obtained 1.5 fold higher H₂ production with the mix of susbtrates cheese whey- organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) than with only the OFMSW, thus validating the particular hypothesis 2: "In the dark solid substrate fermentation, the co-fermentation of the cheese whey and the organic fraction of municipal solid waste will increase the H₂ production than only the use of OFMSW as substrate".

Keywords: cheese whey, dark fermentation, fluidized bed reactor, hydrogen, photoheterotrophic fermentation.

1 Introducción

1.1 Combustibles fósiles

En el 2013, el consumo de energía primaria se incrementó más rápidamente que su producción (BP, 2014). De este consumo, el mayor porcentaje (32.9 %) es cubierto aún por el petróleo (BP, 2014).

El excesivo uso de combustibles fósiles (como el petróleo) ocasiona dos problemas principales:

- (i) Escasez: las fuentes de estos combustibles están a punto de extinguirse, se ha estimado que las reservas mundiales de petróleo se terminen para el año 2050 (Saxena *et al.*, 2009)
- (ii) Contaminación: su uso adiciona 6×10^9 toneladas de carbón por año (en forma de CO_2) a la atmósfera (PPC, 2007).

Debido a lo anterior existe un interés creciente en la obtención de combustibles alternativos a partir de fuentes renovables de energía, entre los que se encuentra el H_2 (Mohan, 2008; Rittmann, 2008).

1.2 Energías renovables

Existen diversas fuentes de energía renovables: solar, geotérmica, eólica, biomasa, oceánica, tracción animal, hidráulica (Jiménez, 2002). En el 2013, este tipo de fuentes de energía, cubrieron un 2.7 % del consumos mundial (BP, 2014).

Nos enfocaremos en la biomasa ya que es la única fuente renovable que puede ser convertida, a conveniencia, en combustibles líquidos, sólidos o gaseosos (Ozbay *et al.* 2001).

1.2.1 Biomasa

Biomasa es un término genérico referido a cualquier producto biológico que sea susceptible de convertirse en energía útil (Jiménez, 2002). La biomasa se puede clasificar en: (i) cosechas específicamente cultivadas por su contenido de energía; (ii) residuos agrícolas; (iii) residuos forestales y (iv) residuos industriales y municipales (Ni *et al.*, 2006; Saxena *et al.*, 2009).

Se considera que la producción anual de biomasa en base seca en el mundo es de 118×10^9 toneladas por año (Rogalinski *et al.*, 2008), que es un valor equivalente a la energía de 60-80 billones de toneladas de aceite crudo (Martinez-Perez *et al.*, 2007).

Además, la biomasa es considerada como una fuente de energía carbono- neutral ya que el dióxido de carbono liberado durante la combustión es absorbido por las plantas durante la fotosíntesis, por lo que el efecto neto en la concentración del dióxido de carbono en la atmósfera se asume que es cero (Albertazzi *et al.*, 2005).

La biomasa puede ser transformada en combustibles líquidos como el etanol (Caspeta *et al.*, 2014), butanol (Jang *et al.*, 2012), etc., o en gaseosos como hidrógeno (Kalinci *et al.*, 2009) y metano (Molinuevo-Salses *et al.*, 2013).

1.3 Hidrógeno como combustible

Uno de los combustibles que se pueden generar a partir de biomasa es el hidrógeno (H_2). El H_2 no es considerado como una fuente primaria de energía, pero sirve como un medio por el cual se puede almacenar, transmitir y utilizar una fuente primaria de energía (Das & Veziroglu 2001).

Algunas de las razones por las que es considerado uno de los combustibles de futuro son:

- (i) Es un combustible amigable con el ambiente, ya que su consumo por la combustión del mismo o a través de celdas de combustible, produce solo agua (Mizuno *et al.*, 2002).
- (ii) Se considera que es igual de seguro de usar que el gas natural (Das & Veziroglu, 2008).
- (iii) Su combustión en automóviles tiene el 50% más de eficiencia que la gasolina.
- (iv) Cuenta con una energía contenida por unidad de masa de 42 kJ/g o 61,000 Btu/lb (Das & Veziroglu, 2008), que es 2.7 veces mayor que la contenida en algunos hidrocarburos (Ramachandran & Menon, 1998).

Existen diversas tecnologías para producir hidrógeno y se pueden clasificar de manera general en químicas y biológicas. De forma química se puede realizar por reformado de vapor, electrólisis proceso termoquímico y oxidación parcial (Dincer,

2000). A su vez, los procesos de producción biológica pueden ser clasificados en tres categorías: procesos fermentativos, procesos fotosintéticos y la reacción biológica de intercambio gaseoso (biological water gas shift reaction).

Actualmente, 40 % del H₂ es producido a través de gas natural, 30 % de aceites pesados y nafta, 18 % de carbón, 4 % por electrólisis y cerca del 1 % producido de biomasa (Das, 2009).

El método más común para producir H₂ es el reformado de vapor de gas natural e hidrocarburos, proceso que requiere altas temperaturas y entradas de energía (Kapdan & Kargi, 2006). A diferencia de esto, la producción de H₂ por medios biológicos tiene el beneficio de llevarse a cabo a temperaturas menores, pero los rendimientos de generación aún son bajos, por lo que es necesario continuar mejorando estos procesos (Manish & Banerjee, 2008).

Dentro de los procesos de la producción fermentativa de H₂, la utilizando residuos orgánicos municipales, agrícolas e industriales está ganando importancia y abriendo una nueva ruta para la generación de esta fuente de energía renovable (Chong *et al.*, 2009; Das y Veziroglu, 2008; Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009).

1.3.1 Proceso fotosintético: Biofotólisis

En este proceso algas o cianobacterias llevan a cabo la fotosíntesis. Usan la energía solar para escindir el agua (produce O₂) y reducir ferredoxin, que a su vez puede reducir una nitrogenasa o hidrogenasa, ambas enzimas productoras de H₂ (Hallenbeck y Gosh, 2009).

1.3.2 Reacción biológica de intercambio gaseoso (biological water gas shift reaction)

Algunas bacterias fotoheterótrofas (como *Rubrivivax gelatinosus*), son capaces de realizar la reacción de intercambio gaseoso a temperatura ambiente y a presión atmosférica (Ec. 1; Amos, 2004). Estas bacterias pueden sobrevivir en oscuridad usando CO como única fuente de carbono para generar adenosin trifosfato (ATP) acoplado a la oxidación de CO con la reducción de H⁺ a H₂ (Kalinci *et al.*, 2009).



1.4 Producción fermentativa de hidrógeno

Dentro de la producción fermentativa de H_2 se encuentra la fermentación oscura y la fotoheterotrofia, procesos que serán descritos a mayor profundidad ya que son los concernientes a este proyecto de investigación.

1.4.1 Fermentación oscura

La fermentación oscura es un proceso de fermentación independiente de la luz, en el se emplean bacterias anaerobias facultativas y anaerobias estrictas (Das & Veziroglu, 2008) para convertir los sustratos ricos en carbohidratos a H_2 y otros productos, principalmente ácidos (acético, láctico, butírico, etc) y alcoholes (etanol, butanol, etc.).

Durante la digestión anaerobia, todo el H_2 producido en los procesos fermentativos primarios es consumido inmediatamente por las bacterias metanogénicas, homoacetogénicas o reductoras de sulfato (estas últimas en ambientes con altas concentraciones de sulfato). Por lo tanto, al inhibir el proceso de metanogénesis se puede evitar la utilización de hidrógeno como precursor del metano y así permitir su acumulación (Valdez-Vazquez *et al.*, 2004).

Existen diversos factores que se deben de tomar en consideración para lograr rendimientos de producción de H_2 altos, entre ellos se encuentran: (i) pH; (ii) temperatura de operación/incubación; (iii) tipo y concentración de sustrato; (iv) tipo de reactor; (v) alcalinidad; (vi) método de enriquecimiento del inóculo, entre otros (Argun *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2010; Cavinato *et al.*, 2011; Kothari *et al.*, 2012; Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009; Van Ginkel *et al.*, 2001). Los factores en los que se enfoca esta investigación son el pH, la temperatura de incubación/operación y el tipo de sustrato.

1.4.1.1 Temperatura de incubación/operación

La temperatura de incubación/operación es un factor de suma importancia ya que puede afectar la velocidad de crecimiento y la actividad metabólica de los

microorganismos, así como la distribución de los productos acuosos y la degradación del sustrato (Lee *et al.*, 2006; Mu *et al.*, 2006).

La temperatura óptima de producción de H₂ en sistemas de cultivo mixto varía ampliamente debido a la presencia de una población bacteriana más compleja (Yu *et al.*, 2002).

La selección de la temperatura a utilizar debe contemplar que la energía necesaria para mantener altas temperaturas de operación en rango mesofílico o termofílico (Kargi *et al.*, 2012) pueden disminuir la energía neta obtenida (Perera *et al.*, 2012). Por lo que es interesante el estudio de la producción de H₂ a temperatura ambiente o en rango psicrófilico, ya que puede representar un ahorro de energía de calentamiento. A pesar de esta ventaja, existen pocos estudios de producción de H₂ a estas temperaturas (Debowski *et al.*, 2014)

1.4.1.2 pH

El pH puede afectar a los microorganismos de diversas formas: (i) impacta la carga eléctrica de la membrana celular; (ii) afecta el consumo de nutrientes; (iii) tiene influencia en la actividad enzimática; y (iv) determina la distribución de los productos de la fermentación (Dabrock *et al.*, 1992; Horiuchi *et al.*, 2002; Li & Fang, 2007; Kataoka *et al.*, 1997; Zhu & Yang, 2004).

Realizar la fermentación a pH bajo puede inhibir a algunos microorganismos consumidores de H₂ (Wu *et al.*, 2010), pero la disminución del pH asociada a una baja alcalinidad y una producción excesiva de ácidos orgánicos puede resultar en el decremento e incluso inhibición de la producción de H₂ (Lin & Lay, 2004). Una alternativa a utilizar es adicionar una solución amortiguadora que compense la disminución del pH resultante de la generación de ácidos orgánicos (Zhu *et al.*, 2009).

1.4.1.3 Sustrato

Existe un interés creciente en utilizar residuos orgánicos como sustrato para la producción de H₂ ya que puede significar el tratamiento de los residuos y a su vez recuperación de energía.

Ya se ha demostrado la factibilidad del uso de este tipo de residuos (Prakasham *et al.*, 2009; Sekoai *et al.*, 2014), siendo un sustrato renovable y de bajo costo, lo que coadyuva, además, a lograr la sustentabilidad del proceso (Ferchichi *et al.*, 2005).

Uno de los residuos que pueden ser utilizados es el suero de leche de la industria láctea.

1.4.1.3.1 Residuos de la industria láctea

La industria láctea genera cantidades significativas de residuos líquidos, mayormente leche diluida, leche separada, crema y suero de leche (Ferchichi *et al.*, 2005; Kisaalita *et al.*, 1987; Valencia & Ramírez-Castillo, 2009). En la Figura 1 se muestra la producción, importación, exportación y consumo de la leche en el 2013 (<http://www.canilec.org.mx/importaciones.html>).

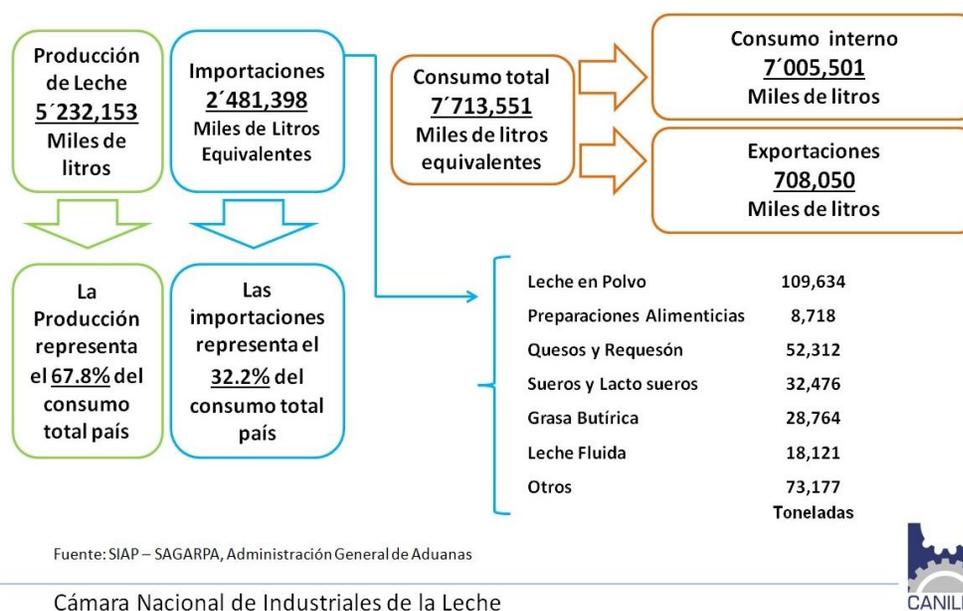


Figura 1. Producción, importación, exportación y consumo de la leche en el 2013
 ((<http://www.canilec.org.mx/importaciones.html>))

La descarga del agua residual sin tratamiento previo se convierte en un foco contaminante (Valencia-Dencia & Ramírez-Castillo, 2009), si se descarga en el suelo puede generar un cambio químico y físico de la estructura del suelo, reducción del

espacio para siembra y contaminación del agua subterránea (Ben-Hassan & Ghaly, 1994).

1.4.1.3.2 Suero de leche

El suero de leche es el líquido que se separa de la leche cuando ésta se coagula para la obtención del queso, son todos los componentes de la leche que no se integran en la coagulación de la caseína. El suero de leche representa cerca del 85–95 % del volumen de la leche y retiene el 55 % de los nutrientes (Mawson 1994; Siso, 1996).

Su composición varía dependiendo del origen y calidad de la leche, técnicas de producción de queso, cantidad de levaduras o ácido usado para la coagulación, temperatura de coagulación y el tipo de queso elaborado (Cunningham *et al.*, 2000; Kavacik & Topaloglu, 2010), algunas caracterizaciones del suero se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición del suero de leche

Lactosa (%)	Proteína cruda (%)	Cenizas (minerales) (%)	Grasa (%)	DQOT (Kg/m ³)	DQOS (Kg/m ³)	SST (Kg/m ³)	SSV (Kg/m ³)	NT (g/m ³)	N-NH ₄ ⁺ (g/m ³)	NO (g/m ³)	PT (g/m ³)	pH	Ref.
45-50	6-8	8-10*	4-5										1
70-2*	8-10	12-15*											2
				73-86	59-71	20-22	8.5-13.2	897-1200	58-150	832-1040	420-540	4.5-5.0	3
79	8.4	5.6-8.4	<2.5										4
83				1.03**				5.49***					5
				67				1335				4.7	6

1. Ferchichi *et al.*, 2005; 2. Panesar *et al.*, 2007; 3. Farizoglu *et al.*, 2004; 4. Suarez *et al.*, 2006; 5. Yang *et al.*, 2007; 6. Castello *et al.*, 2009. Notas: DQOT: demanda química de oxígeno total; DQOS: demanda química de oxígeno soluble; SST: sólidos suspendidos totales; SSV: sólidos suspendidos volátiles; NT: nitrógeno total; N-NH₄⁺: nitrógeno amoniacal; N-NO₃: NO: nitrógeno orgánico y PT: fósforo total; * extracto seco; **Kg/Kg; *** g/Kg

El suero de leche contiene, además, 8.7 (g/kg) de calcio, 23.5 (g/kg) de potasio y 5.7 (g/kg) sodio; sales minerales de NaCl y KCl (>50%) y sales de calcio

(principalmente fosfatos). También contiene compuestos de nitrógeno no proteínicos como urea y ácido úrico, y vitaminas del grupo B (Panesar *et al.*, 2007; Siso, 1996).

De acuerdo a su acidez, el suero se divide en dulce (pH mayor de 8), medio ácido (pH 5-5.8) y ácido (pH menor a 5), el suero más ácido tiene mayor contenido de minerales que los lactosueros de quesos menos ácidos (Cunningham *et al.*, 2000). En México, el suero que se produce es dulce y medio ácido (García *et al.*, 1993; Kirk *et al.* 2005).

1.4.1.3.3 Tratamiento y reutilización del suero de leche

El suero de leche es uno de los materiales más contaminantes que existen en la industria alimentaria (Cunningham *et al.*, 2000). Una industria quesera media que produzca diariamente 40,000 litros de suero sin depurar genera una contaminación diaria similar a una población de 1, 250, 000 habitantes (Valencia-Dencia & Ramírez-Castillo, 2009).

El suero obtenido por kg de queso varía desde 4 L/kg queso fresco hasta 11.3 kg de suero/ kg de queso de pasta dura (Valencia, 2008). La producción mundial anual estimada de suero lácteo es de aproximadamente 145 millones de toneladas, de las cuales 6 millones son de lactosa, el suero producido en México contiene aproximadamente 50 mil toneladas de lactosa potencialmente transformable y 9 mil toneladas de proteína potencialmente recuperable (Carrillo Aguado, 2006).

Una forma de dar tratamiento al suero de leche es mediante procesos anaerobios (Ergüder *et al.*, 2001; Mockaitis *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 1999; Saddoud *et al.*, 2007). Se ha observado que la alta capacidad contaminante del suero de leche (DBO entre 30-50 g/L y DQO, aproximadamente 70 g/L), la alta cantidad de ácido láctico presente en él, la baja alcalinidad por bicarbonato (2.5 kg/m^3 como CaCO_3 ; Mawson, 1994) y su tendencia a ser acidificado rápidamente alteran significativamente los procesos biológicos que se llevan a cabo en las plantas de tratamiento (Malaspina *et al.*, 1996; Valencia Denicia & Ramirez-Castillo, 2009).

También se ha pensado en otros procesos para la recuperación del valor de los sólidos en el suero de leche: centrifugación del lactosuero y procesamiento subsiguiente para recuperar la mayoría de la materia grasa en forma de crema o mantequilla; y su

uso como materia prima para elaborar otros productos (Cunningham *et al.*, 2000; Valencia Denicia & Ramirez-Castillo, 2009) entre los que se encuentran:

- (i) Procesos fermentativos: como medio de cultivo para la producción de biomasa, metabolitos, enzimas y biocombustibles.
- (ii) Elaboración de bebidas: bebidas o fórmulas lácteas con valor nutritivo.
- (iii) Empaques: biopelículas.

A pesar de que existen una variedad de desarrollos tecnológicos para la transformación del suero de leche en otros productos útiles, la utilización o disposición del suero sigue siendo uno de los problemas significativos de la industria láctea (Calli & Yukselen, 2004; Feng *et al.*, 2005; Ferchichi *et al.*, 2005; Mawson, 1994; Nath *et al.*, 2008). Aproximadamente 47% de la producción mundial se desecha en el medio ambiente (Saddoud *et al.*, 2007). Se estima que en México se aprovecha sólo se acerca el 10%.

Refiriéndonos al uso del suero de leche como sustrato para generar H₂ como biocombustible, uno de los componentes principales del suero de leche es la lactosa (en algunos casos el 70%), su fermentación se puede escribir como se indica en la ecuación 2.



Basada en la ecuación anterior, el rendimiento teórico de lactosa puede ser de 8 mol de H₂/mol lactosa, el cuál es mejor que a partir de glucosa, sin embargo los mayores rendimientos encontrados no han alcanzado el teórico esperado (2.7 y 3.7 mol H₂/mol lactosa; Collet *et al.* 2003; Calli *et al.*, 2008; Ferchichi *et al.*, 2005).

1.4.1.3.4 Contenido de nitrógeno en el sustrato

El suero de leche tiene un contenido alto de nitrógeno (Tabla 3), esto es de tomarse en cuenta ya que se sabe que el nitrógeno es uno de los componentes significativos para el crecimiento de las bacterias productoras de H₂ (Li & Fang ,2007). Una concentración adecuada de nitrógeno incrementa la producción de hidrógeno, pero a concentraciones muy altas, se puede inhibir la producción debido al cambio en el pH

intracelular que incrementa los requerimientos de energía o se puede inhibir enzimas específicas relacionadas con la producción de H₂ (Bissailon *et al.*, 2007).

1.4.1.4 Reactores para la producción de H₂

Un gran porcentaje de los estudios de producción de H₂ se han realizado en reactores continuos de tanque agitado, debido su construcción simple, fácil operación y a que tiene un mezclado homogéneo efectivo. Sin embargo, el tiempo de retención hidráulico (TRH) controla el crecimiento microbiano y por lo tanto el TRH debe ser mayor que la tasa máxima de crecimiento de los microorganismos, porque velocidades mayores de dilución causan pérdida de microorganismos (de Amorim *et al.*, 2009).

Para evitar este inconveniente se puede utilizar reactores que realizan la retención física de la biomasa microbiana, ya que el crecimiento y concentración de los microorganismos son independientes del TRH y se pueden alcanzar concentraciones celulares altas (Barros *et al.*, 2010).

1.4.1.4.1 Reactor de lecho fluidizado

El reactor de lecho fluidizado (RLF) consiste principalmente en una columna que contiene un soporte de material inerte o gránulos que son mantenidos en suspensión debido a la fuerza de arrastre del flujo ascendente, los microorganismos son retenidos en forma de biopelícula en el soporte (Hawkes *et al.*, 2007; Qureshi *et al.*, 2005).

Este tipo de reactor ha sido usado ampliamente como un sistema de tratamiento de agua residual, caracterizado por altas eficiencias y el uso de bajo tiempo de retención hidráulico (Lin *et al.*, 2006).

Entre las ventajas del RLF se encuentran: (i) se alcanzan velocidades altas de transferencia de masa; (ii) se tiene la habilidad de controlar y optimizar el grosor de la biopelícula; (iii) el soporte de la biomasa puede ser escogido dependiendo de la aplicación; (iv) la recirculación de los efluentes tratados significa que se tiene un patrón hidráulico excelente que evita cortocircuitos y zonas muertas (Iza, 1991; Switzenbaum, 1983).

A pesar de que el reactor tiene características favorables para la producción de gases como el H₂, han sido utilizados menos frecuentemente para este fin. En los

estudios en los que se ha utilizado los RLF para la producción de H₂, se han utilizado distintos soportes, principalmente carbón activado (Zhang *et al.*, 2007), zeolita (Koskinen *et al.*, 2007), arcilla expandida (Shida *et al.*, 2009) y poliestireno (Ferreira Rosa *et al.*, 2014).

1.5 Fotofermentación

La fotofermentación es la conversión fermentativa de un sustrato orgánico por bacterias púrpuras no del azufre (BPNS) que usan luz solar como energía para convertir los compuestos orgánicos en H₂ y CO₂ (Azwar *et al.*, 2014).

En la fotofermentación, el carbono del sustrato es alimentado al ciclo de los ácidos tricarbónicos (CAT) en donde es oxidado a CO₂ y electrones, en paralelo se encuentra trabajando el aparato de membrana fotosintético que convierte la energía luminosa en ATP.

Estos eventos derivan en un proceso cíclico de transporte de electrones (Wraight *et al.*, 1978), durante el transporte de electrones los protones son bombeados a través de la membrana y se desarrolla un gradiente de protones que es usado por la enzima ATP sintasa para generar ATP, la energía extra en la forma de ATP puede ser usada para transportar electrones. El ATP es canalizado a la nitrogenasa junto con electrones y protones, una parte de los protones es suplementado por el CAT y la otra parte por el ATP sintetasa, esto más el aceptor de electrones ferredoxin se dirigen a la nitrogenasa y si no se encuentra presente el nitrógeno se reducen los protones a hidrógeno gaseoso (Figura 2; Akkerman *et al.*, 2002; Koku *et al.*, 2002).

Además del H₂, las BPNS pueden producir un sub-producto llamado poli-β-hidroxi-butarato que es biodegradable, termoplástico y de interés médico (De Philipps *et al.*, 1992; Reddy *et al.*, 2003). La producción ocurre cuando es inhibida o reprimida la nitrogenasa, ya que la actividad del CAT es limitada severamente y se siguen otras vías alternativas, como la de síntesis de polisacáridos, un efecto similar ocurre cuando la relación carbono/nitrógeno es baja (Koku *et al.*, 2002).

Para obtener una buena producción de H₂ se debe considerar lo siguiente (Koku *et al.*, 2002):

- (i) Máxima actividad de nitrogenasa y mínima actividad de hidrogenasa

- (ii) El uso de sustratos que sean favorables para la producción de H_2 y menos favorable para la producción de PHB, entre ellos se encuentran lactato e intermediarios del ácido tricarboxílico como malato y succinato
- (iii) Una relación de carbono/nitrógeno favorable
- (iv) Optimización de factores como la edad del cultivo

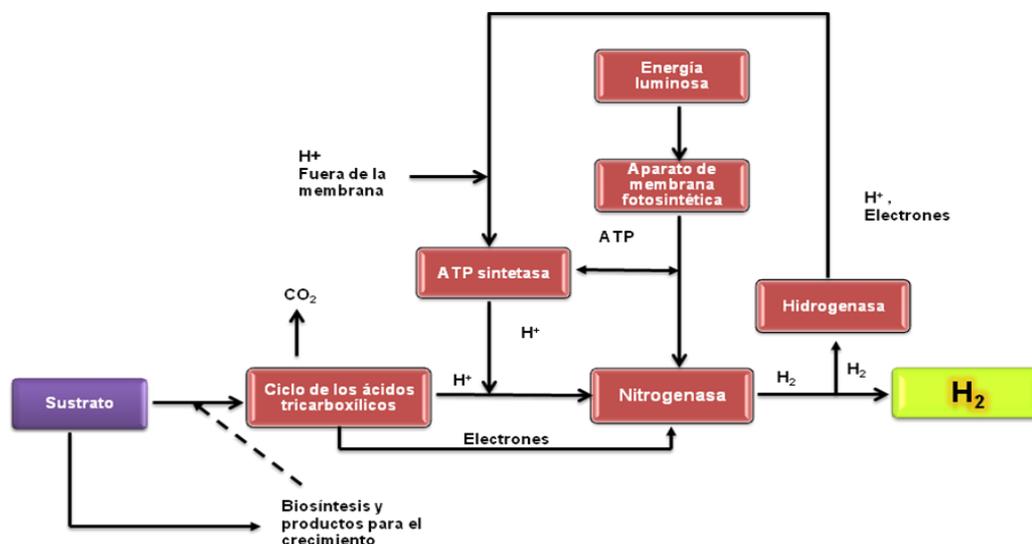


Figura 2. Esquema general de la hidrogenogénesis fotoheterótrofa (Adaptado de Koku *et al.*, 2002)

1.5.1 Bacterias púrpura no del azufre

Las BPNS son microorganismos que tienen la capacidad de crecer como fotoheterótrofos, fotoautótrofos o quimioheterótrofos; dependiendo de las condiciones anaerobiosis y de fuente de carbono (Basak & Das, 2007). En condiciones anaerobias, las BPNS expresan su aparato fotosintético y mediante la bacterioclorofila (Senge & Smith, 1995) y la bacteriofeofitin-quinona (Deisenhofer & Michel, 1989; Heathcote *et al.*, 2002) absorben y utilizan la luz del sol (Cogdell, 2004).

El oxígeno es el principal regulador de la síntesis de su aparato fotosintético. La presencia O_2 suprime inmediatamente la síntesis de las bacterioclorofilas, el efecto es reversible y la síntesis continúa una vez que la tensión del oxígeno es eliminada (Koku *et al.*, 2002).

Las ventajas del uso de BPN es que cuentan con un: (i) rendimiento alto de conversión de sustrato a producto; (ii) la habilidad para usar un amplio espectro de luz (522-860nm); (iii) capacidad para usar sustratos orgánicos, los sustratos orgánicos

pueden ser residuos o lixiviados de la fermentación oscura (i.e. ácido acético); (iv) habilidad de convertir completamente ácidos orgánicos en H₂ y CO₂; y (v) la concentración del H₂ es 75-90 % lo que simplificaría el proceso de purificación del biogás (Akkerman *et al.* 2002; Fascetti *et al.* 1998; Levin *et al.*, 2004; Miyake *et al.*, 1982; Miyake & Kawamura 1987; Tao *et al.*, 2008).

1.5.2 Nitrogenasa

La nitrogenasa es la enzima responsable de la producción de H₂ a partir de protones, y de la fijación de nitrógeno (Ec 3; Koku *et al.*, 2002).



En la presencia de N₂ la reacción que domina es la de fijación de nitrógeno y se vuelve insignificante o se detiene la producción de H₂ (Sasikala *et al.* 1990).

Se han identificado tres tipos diferentes de nitrogenasas: (i) Mo-nitrogenasa; (ii) V-nitrogenasa y (iii) Fe-nitrogenasa. La operación eficiente de la nitrogenasa requiere grandes cantidades de ATP y poder reductante, es por eso que la enzima se encuentra sujeta a controles estrictos de regulación (Koku *et al.*, 2002). El primer inhibidor/represor es el oxígeno que la destruye, el segundo inhibidor es el NH₄⁺ que reprime la síntesis e inhibe la actividad de la enzima (Cheng *et al.*, 2012; Gest *et al.*, 1950; Jones & Monty, 1979). La inhibición es reversible ya que la nitrogenasa recupera su actividad una vez que el nitrógeno es removido o consumido (Koku *et al.*, 2002).

1.5.3 Hidrogenasa

Existen 3 clases diferentes de hidrogenasa que han sido identificadas: [Fe]-hidrogenasa, hidrogenasa, [NiFe]-hidrogenasa, y [NiFeSe]. En muchos casos se ha observado que la [NiFe]-hidrogenasa es responsable del consumo del H₂, mientras que [Fe]-hidrogenasa cataliza la producción de H₂ (Cammack, 1999). La hidrogenasa cataliza la siguiente reacción redox (Ec. 4; Basak & Das, 2007):



Se ha observado que en *Rhodobacter capsulatus* la actividad de producción de H₂ es menos del 10 % de la actividad de consumo (Gogotov, 1986; Zorin, 1986), por lo tanto la actividad de consumo es crítica a considerar para la producción fotoheterótrofa de H₂. Actualmente se están realizando esfuerzos para modificar microorganismos por medio de herramientas de biología molecular para eliminar la capacidad de síntesis de la enzima.

La hidrogenasa es inhibida por monóxido de carbono por oxígeno y por la presencia del ácido etilendiaminotetraacético (Kern *et al.*, 1994), teniendo una capacidad de resistencia al oxígeno mayor que la nitrogenasa.

1.5.4 Inhibición por NH₄⁺

En varios estudios se ha mostrado que la adición de NH₄⁺ causa inhibición completa de la actividad de la nitrogenasa de BPNS en 2-3 minutos (Yakunin & Hallenbeck, 2002). La recuperación de la tasa de actividad inicial de la nitrogenasa requiere un periodo de tiempo largo y depende de la cantidad de NH₄⁺ adicionado (Sweet & Burris, 1981; Zumft & Castillo, 1978).

Una concentración de 14 mM de NH₄⁺ es suficiente para prevenir de forma completa la producción de hidrógeno en *Rhodobacter sphaeroides* (Tao *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2002). Sin embargo, concentraciones mayores (>15 mM en muchos casos) se encuentran en varios tipos de agua residual (Li *et al.*, 2010), por ejemplo, en las aguas residuales de las plantas que producen fertilizantes nitrogenados.

1.6 Procesos de producción de H₂ de dos etapas

Una vez que se han descrito los procesos biológicos de producción de H₂, en la Tabla 2 se muestran las ventajas y desventajas de cada proceso. Se puede observar que el acoplamiento de dos procesos biológicos podría disminuir las desventajas e incrementar el rendimiento de producción (Argun & Kargi, 2010).

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los procesos biológicos de producción biológica de H₂

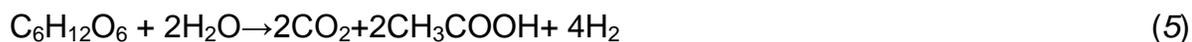
	Proceso	Ventajas	Desventajas
Fotosintético	Biofotólisis	<ul style="list-style-type: none"> • Se producen compuestos simples (H₂ y CO₂) 	<ul style="list-style-type: none"> • Bajas eficiencias de conversión de luz • Enzimas sensibles al O₂ • Uso de fotobiorreactores caros
Fermentativos	Fotofermentación	<ul style="list-style-type: none"> • Conversión completa de ácidos orgánicos residuales a H₂ y CO₂ • Uso potencial de agua residual 	<ul style="list-style-type: none"> • Bajas eficiencias de conversión de luz • Alta demanda de energía por la nitrogenasa • Uso de fotobiorreactores caros
	Fermentación oscura	<ul style="list-style-type: none"> • No necesita de energía de la luz • Se puede usar una gran variedad de residuos • Tecnología de reactores simple 	<ul style="list-style-type: none"> • Rendimientos bajos de producción de H₂ • Gran cantidad de productos formados (ácidos orgánicos)
Reacción biológica de intercambio gaseoso	Reacción biológica de intercambio gaseoso	<ul style="list-style-type: none"> • No es necesario reactores caros • Reduce la cantidad de material celular residual 	<ul style="list-style-type: none"> • Genera menos energía para actividades metabólicas que las vías fotosintéticas o aerobias • Menor velocidad de crecimiento celular

El principio básico de un proceso de dos etapas es el siguiente (Hallenbeck & Gosh, 2009).

- (i) Primera etapa: se lleva a cabo la fermentación del sustrato a H₂ y ácidos orgánicos.
- (ii) Segunda etapa: se obtiene energía gaseosa adicional, ya sea metano o más hidrógeno, a partir de los efluentes del primer reactor.

Una de las posibilidades de un proceso en dos etapas es el uso de la fermentación oscura en la primera etapa y fotofermentación en la segunda, esto con el objetivo de recuperar H₂ adicional a partir de productos de la fermentación oscura (Argun & Kargi, 2011; Azwar *et al.*, 2014; Basak & Das, 2007; Laurinavichene *et al.*, 2012; Redwood *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2013).

El rendimiento teórico de la combinación de la fermentación oscura y la fotofermentación usando acetato como sustrato es de 12 mol de H₂ por mol de glucosa (Ec 5 y 6; Basak & Das, 2007; Eroglu & Melis, 2011; Kapdan & Kargi, 2006).



La factibilidad de sistema en donde se acopla fermentación oscura-fotofermentation ya ha sido demostrada, pero los rendimientos han sido menores al estequiométrico (Nath *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2007) por lo que es necesario seguir con el estudio de las variables que afectan este tipo de procesos.

1.7 Caracterización de la comunidad microbiana

La caracterización de la comunidad microbiana en un bioreactor es fundamental para el entendimiento del proceso (Miura *et al.*, 2007). Una de las formas de realizar esta caracterización es mediante el uso de técnicas cultivo-independientes que involucran el análisis de una pequeña parte del genoma, como un gen o una región intergénica específica del DNA.

Entre las técnicas se incluyen: genotecas de clonas, electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE), hibridación fluorescente in situ (FISH), PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), análisis de espacio intergénico del DNA ribosomal (Rittmann *et al.*, 2008) y secuenciamiento masivo de una genoteca de 16S rDNA (Merriman *et al.*, 2012)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) proporcionan métodos analíticos de investigación de las poblaciones microbianas sin una separación previa de cada tipo de microorganismo (Muyzer & Smalla, 1998). Estas técnicas han sido reconocidas como una herramienta molecular capaz para analizar las comunidades microbianas que producen hidrógeno (Fang *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2007; Ueno *et al.*, 2001).

Por otro lado, el secuenciamiento masivo de una genoteca de 16S rDNA es una tecnología de siguiente generación que revela la secuencia de millones y potencialmente billones de secuencias simultáneamente (Merriman *et al.*, 2012).

1.7.1 Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante

En el DGGE, a una mezcla de fragmentos de DNA de diferente secuencia se les realiza una electroforesis en un gel con un gradiente creciente de un desnaturizante. La separación se basa en que los fragmentos de DNA con alto contenido de GC son más estables y mantienen la doble cadena hasta que se encuentran con una alta concentración de desnaturizante (Green, 2005). Además, la reacción de secuenciación de las bandas (escindidas del gel de DGGE) permite la identificación de algunos miembros de la población microbiana (Etchebehere, 2002).

La hipótesis fundamental subyacente de la interrelación de los datos del DGGE es que la diversidad original y la abundancia relativa de diferentes amplicones en el DNA de una muestra no se alteran durante la PCR y se asume que el número de bandas refleja la diversidad de microorganismos en la muestra (Miura *et al.*, 2007).

Los pasos principales para realizar el DGGE son (Muyzer *et al.*, 1993):

1. Extracción del DNA genómico
2. Amplificación (por PCR) utilizando primers diseñados con pinza de GC
3. Separación electroforética utilizando un gradiente desnaturizante

Algunas dificultades metodológicas del DGGE que se deben tener en consideración son: (i) el sesgo en la PCR (Ferris & Ward, 1997; Katano & Fukui, 2003); (ii) la co-migración del DNA de diferentes especies en la misma banda (Sekiguchi *et al.*, 2001); (iii) la formación de banda múltiples en la amplificación de genes de genomas simples (Brosius *et al.*, 1981) y (iv) la dificultad de lograr extracciones de DNA reproducibles y eficientes de muestras ambientales (Niemi *et al.*, 2001).

1.7.2 Secuenciamiento masivo de una genoteca de 16S rDNA

El concepto básico de este tipo de secuenciamiento es realizar un secuenciamiento mediante síntesis, con una detección electroquímica de la síntesis y cada reacción acoplada a su propio sensor, que a su vez es organizada en un arreglo masivo de sensores en paralelo en un chip CMOS (semiconductor de metal-óxido, por sus siglas en inglés; Merriman *et al.*, 2012)

La base de la detección es que el sensor utilizado es capaz de detectar tanto el pirofosfato liberado por la incorporación de la polimeras, como el ion H^+ de la

incorporación del OH⁻ en la cadena creciente producto químico de la síntesis (incorporación de la polimerasa; Merriman *et al.*, 2012).

A continuación se darán algunas definiciones que ayudan a entender mejor el análisis de la comunidad microbiana.

1.7.3 Diversidad alfa, beta y gamma

En la práctica, la diversidad puede ser cuantificada de cualquier conjunto de datos (individuos) en donde las unidades de observación han sido clasificadas en tipos (especies), lo que se necesita saber es la proporción de las unidades observadas pertenecientes a cada tipo o la abundancia. Se considera que la diversidad es igual a la inversa de la abundancia y cuantifica el número efectivo de los tipos de interés (Tuomisto, 2010).

Si el conjunto de datos consiste en subunidades, el número efectivo total de especies (diversidad gamma) puede ser dividido en el número efectivo de subunidades de composición distinta (diversidad beta) y el número efectivo de especies por cada subunidad es la diversidad alfa (Tuomisto, 2010).

Así, la diversidad gamma se refiere al total de especies observadas en el conjunto de datos de interés. La diversidad alfa y la beta se obtienen cuando la gamma diversidad es dividida en dos componentes que toman en cuenta los límites entre subunidades (Whittaker, 1960).

2 Justificación

Debido al agotamiento de los recursos energéticos no renovables y a que la utilización de estos produce grandes cantidades de contaminantes, surge la necesidad de encontrar nuevas formas de obtener energía viable y sustentable. El hidrógeno como combustible tiene un gran potencial para ser usado, siendo versátil, eficiente y seguro en comparación con otros biocombustibles.

En paralelo, el suero de leche a pesar de las características y bondades puede ser un foco contaminante si se descarga sin tratamiento previo. Su uso como sustrato para la producción de H_2 ayudaría a disminuir el problema de contaminación debido a la mala disposición de residuos y al uso de combustibles fósiles.

La producción biológica de hidrógeno es una de las mejores opciones, ya que es amigable con el ambiente en comparación con los métodos químicos. Actualmente, existe la tendencia del uso de un sistema acoplado con dos procesos biológicos para incrementar los rendimientos de producción de H_2 y se requieren más estudios para mejorar los rendimientos obtenidos.

3 Alcance

Se obtuvo hidrógeno a partir de suero de leche en un proceso de dos etapas: primero una fermentación oscura y posteriormente una foto-fermentación; además de la co-fermentación de algunos residuos orgánicos y el estudio de las comunidades microbianas en tiempos seleccionados.

En la fase de fermentación oscura se evaluó lo siguiente: *(i)* el potencial hidrogenogénico del suero de leche en reactores en lote y *(ii)* la fermentación del suero de leche en continuo en reactores de lecho fluidizado a temperatura ambiente y 35°C.

Posteriormente, se realizó una foto-fermentación utilizando el efluente de la fermentación en continuo.

En paralelo, se realizó la fermentación oscura de mezclas de sustratos orgánicos y finalmente se estudiaron las comunidades microbianas y su asociación con la producción de hidrógeno en experimentos selectos de producción de hidrógeno.

El contexto de los antecedentes expuestos nos permite postular lo siguiente:

4 Hipótesis

4.1 Hipótesis General

El proceso de fermentación oscura acoplada con foto-fermentación, utilizando suero de leche como sustrato, incrementará en al menos 50 % la producción de hidrógeno comparada con solo la fermentación oscura.

4.2 Hipótesis Particulares

1. La producción de H_2 a temperatura ambiente será similar e incluso mayor que a $35^\circ C$, en fermentación en lote.
2. En la fermentación oscura en estado sólido, el suero de leche en co-fermentación con la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) tendrá mayor producción de H_2 que solo el uso de FORSU como sustrato.

5 Objetivos

Para validar la hipótesis formulada anteriormente, se establecieron los objetivos siguientes:

5.1 General

Producir H₂ en un sistema acoplado de fermentación oscura y foto-fermentación, utilizando suero de leche como sustrato.

5.2 Particulares

- Evaluar la producción de H₂, usando suero de leche como sustrato, en reactores de lecho fluidizado a escala laboratorio, operados a temperatura ambiente y 35° C.
- Caracterizar las comunidades microbianas y su asociación con la producción de hidrógeno en experimentos de fermentación oscura
- Determinar el potencial hidrogenogénico del suero de leche en experimentos en lote, basados en la concentración inicial de materia orgánica, pH y temperatura de operación.
- Evaluar la hidrogenogénesis foto-heterótrofa de suero fermentado usando un consorcio seleccionado de bacterias púrpuras no del azufre y *Rhodopseudomonas palustris*.
- Evaluar la fermentación oscura de mezclas selectas de sustratos orgánicos.

6 Metodología

6.1 Estrategia experimental

El proyecto se dividió en 4 fases y 6 actividades (Figura 3), que de manera general se refiere a: (i) experimentos de fermentación sumergida oscura; (ii) estudio de la comunidad microbianas en experimentos de fermentación oscura; (iii) fermentación fotoheterótrofa; y (iv) fermentación en estado sólido oscura de mezclas de sustratos.

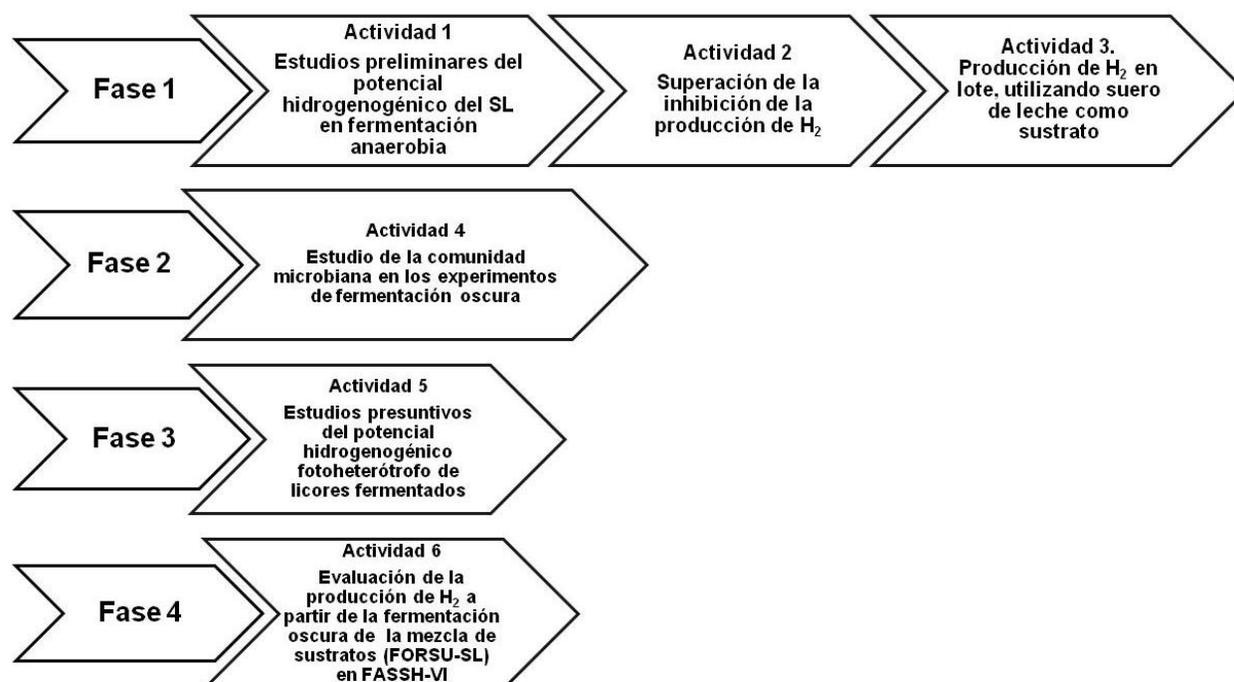


Figura 3. Plan de trabajo. SL: suero de leche; FORSU: fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos; FASSH-VI: fermentación anaerobia en sustrato sólido con venteo intermitente

6.2 Actividad 1. Estudios preliminares del potencial hidrogenogénico del suero de leche en fermentación anaerobia

6.2.1 Actividad 1.1 Arranque y operación de reactores anaerobios metanogénicos (DAM)

6.2.1.1 Propósito

El propósito de esta actividad fue obtener y caracterizar el inóculo metanogénico que se utilizó en los reactores de lecho fluidizado.

6.2.1.2 Diseño experimental y equipamiento del experimento

El diseño experimental consistió en arrancar y operar dos reactores metanogénicos (DAM) con un tiempo de retención másico de 21 días, 10 % ST e incubados a 35° C.

6.2.1.3 Seguimiento y análisis

En la Tabla 3 se muestra el programa de seguimiento y análisis para los DAM. La alimentación se realizó dos veces por semana, se midió el volumen de biogás y la concentración de metano en la fase gaseosa; la concentración de DQO, el pH y el parámetro α en el efluente.

Las variables de respuesta fueron: productividad de biogás y eficiencia de remoción de materia orgánica (DQO).

Tabla 3. Programa de seguimiento y análisis DAM

Parámetro	Alimentación	Fase líquida	Fase gaseosa	Método
Concentración de DQO	2-semana	2-semana	NA	1
pH	2-semana	2-semana	NA	1
Parámetro α	NA	2-semana	NA	2
Concentración de metano en el biogás	NA	NA	2-semana	3
Volumen de biogás	NA	NA	Diario	4

Notas: 1. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1987); 2. Poggi-Varaldo *et al.*, 1997b; 3. Cromatografía de gases con detector de conductividad térmica; 4. Desplazamiento de salmuera. NA: no aplica.

El contenido de CH₄ se determinó por cromatografía de gases en un cromatógrafo GOW-MAC modelo 69-350 con un detector de conductividad térmica (TCD). Se utilizó una columna de gel de sílica (60/80) 18ft x 1/8" OD, SS. El gas acarreador utilizado fue Argón a 0.55 mL/s, las temperaturas de la columna, detector e inyector fueron: 25, 100 y 25° C respectivamente, con un voltaje de 80mA.

El volumen de biogás producido se midió de manera indirecta a través del desplazamiento de salmuera. La salmuera consistió en una solución saturada de NaCl acidificada a pH 3 con ácido sulfúrico.

6.2.1.4 Métodos analíticos y procedimientos

Los DAM tuvieron una capacidad de 1 kg de masa, el tiempo de retención másico final fue de 21 días (Valdés, 1997).

El inculo de los DAM consistió en: 1/3 de excreta de vaca, un 1/3 de lodos activados y 1/3 de tierra de jardín. Se gaseó con N₂ para favorecer la anaerobiosis. El arranque se realizó con sacarosa, hasta obtener 10 % de ST. Posteriormente, se alimentaron con la solución descrita en la Tabla 4.

Tabla 4. Solución de alimentación DAM

Componente	Concentración
Lodos activados (gSV/L)	2.5
FORSU (%)	7
Ácido acético (mL/L)	1.5
Bicarbonato de sodio	*
Fosfato de potasio dibásico	*

Nota:* de acuerdo a los resultados del parámetro α

6.2.2 Actividad 1.2 Arranque y operación reactores anaerobios de lecho fluidizado (RLF).

6.2.2.1 Propósito

Operar reactores anaerobios de lecho fluidizado a escala laboratorio, uno a 35° C y uno a temperatura ambiente, usando suero de leche como sustrato.

6.2.2.2 Diseño experimental y equipamiento del experimento

El RLF consistió en una columna de vidrio de 4.5 cm de diámetro interno, 185 cm de longitud y 3 L de volumen útil (Figura 4). El lecho del reactor consistió en partículas de carbón activado con un diámetro promedio de 1-2 mm y un volumen total de 1 L. El tiempo de retención hidráulico fue de 1 día (base volumen del lecho).

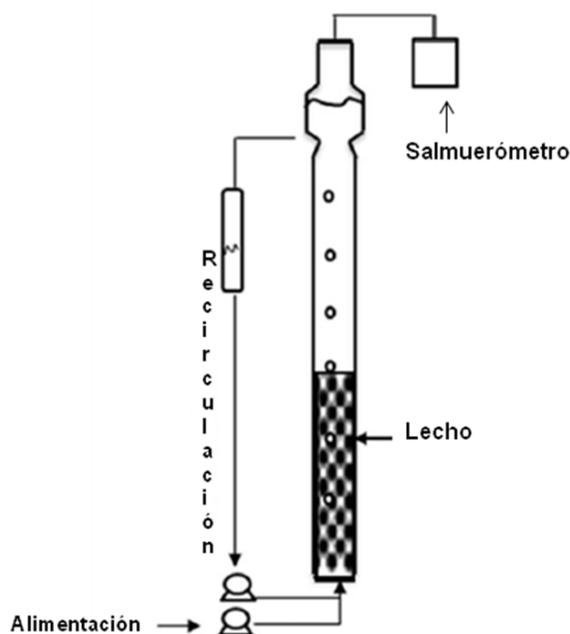


Figura 4. Esquema del reactor de lecho fluidizado

6.2.2.3 Seguimiento y análisis

En la Tabla 5 se muestra el programa de seguimiento y análisis de los RLF. El contenido de H_2 y CH_4 se determinaron por cromatografía de gases en un cromatógrafo GOW-MAC modelo 69-350 con un detector de conductividad térmica (TCD). Se utilizó

una columna de gel de sílica (60/80) 18ft x 1/8" OD, SS. Utilizando Argón a 0.55 mL/s como gas acarreador, las temperaturas de la columna, detector e inyector fueron: 25, 100 y 25° C respectivamente, con un voltaje de 80mA.

Tabla 5. Programa de seguimiento y análisis de los reactores de lecho fluidizado

Parámetro	Alimentación	Efluente	Lecho	Fase gaseosa	Método
Concentración (DQO)	2- semana	2-semana	NA	NA	1
Metabolitos orgánicos volátiles y solventes	NA	2-semana	NA	NA	2
Concentración de H₂ y CH₄ en el biogás	NA	NA	NA	2-semana	3
pH	2-semana	2-semana	NA	NA	1
Nitrógeno Kjeldahl y amoniacal	NA	NA	2-periodo	NA	1
Volumen de biogás	NA	NA	NA	Diario	4
Extracción de DNA	1-Lote	NA	1-periodo	NA	5

1. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1987); 2. Cromatografía de líquidos de alta resolución; 3. Cromatografía de gases con detector de conductividad térmica. 4. Desplazamiento de salmuera, 5. PowerSoil® DNA Isolation Kit

El volumen de biogás se midió como en la actividad 1.1. La concentración de ácidos orgánicos y solventes en los sólidos gastados se determinó en un cromatógrafo de gases Varian Star 3400 equipado con un FID. La temperatura del inyector y detector fue de 250° C. El gas acarreador fue nitrógeno y la velocidad de flujo fue de 20 mL/min. El programa utilizado fue: 60° C por 2 min, incrementando hasta 140° C a 5° C/min, y se mantuvo constante 6 min. El diámetro interno de la columna de capilar de silica fundida cubierta con 0.2 mm de CP-Wax 57 CB es de 50m x 0.32mm.

6.2.2.4 Métodos analíticos y procedimientos

Las variables de respuesta fueron: porcentaje de hidrógeno en el biogás, rendimiento de producción de hidrógeno, relación concentración ácido acético/concentración ácido butírico base DQO $(A/B)_{DQO}$, y la relación de la sumatoria de ácidos orgánicos/solventes $(\rho = \Sigma AOV / \Sigma Solventes)$.

En la Figura 5 se muestra las diversas etapas del proceso del RLF que se explicarán a continuación:

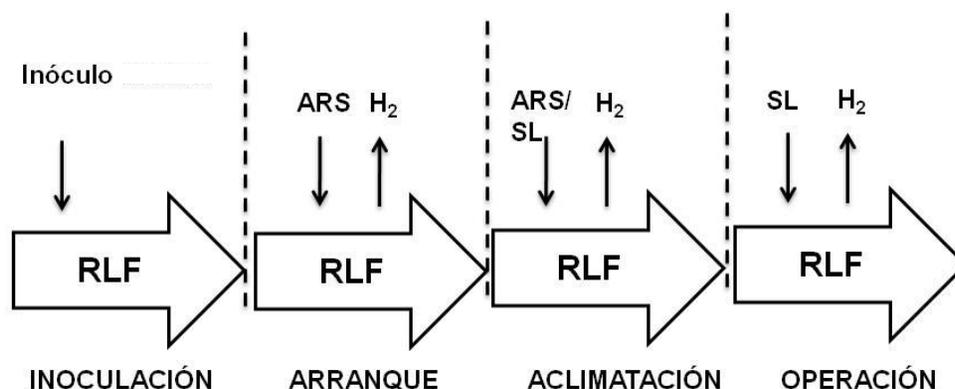


Figura 5. Etapas RLF. ARS: agua residual sintética; SL: suero de leche

6.2.2.4.1 Inoculación

La biomasa resultante de los DAM operados en la actividad 1.1 se utilizaron como inóculo, previo tratamiento térmico (tt). El tt consistió en calentar la biomasa a 90°C por 1 h (Barros *et al.*, 2010; de Amorim *et al.*, 2009; Shida *et al.*, 2009; Valdez-Vazquez *et al.*, 2006a).

6.2.2.4.2 Arranque

Se adicionó a cada reactor: 1.3 L de medio mineral (Tabla 6; modificada de Moreno-Medina, 2011), 1 L de carbón activado, 600 mL de inóculo (Zhang *et al.*, 2007), y 0.5 L del agua de alimentación (Zhang *et al.*, 2007). Posteriormente, se procedió al barrido con N₂ durante 10 minutos. El sistema se mantuvo en lote por 96 h para favorecer la formación de las biopartículas.

Tabla 6. Medio mineral

Componente	Concentración (g/L)
Sacarosa	2
KH ₂ PO ₄	5
NaHCO ₃	1

Para proceder al arranque del reactor se utilizó como sustrato un agua de alimentación sintética (ARS; Tabla 7; Leite *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2007) con una concentración de sacarosa que inició con 5 g/L, posteriormente 8 g/L y finalmente 10 g/L. La duración de cada etapa fue de aproximadamente 30 días.

Tabla 7. Composición del agua residual sintética

Componente	Concentración (mg/L)
Azúcar	*
CH ₄ N ₂ O	125
NiSO ₄ *6H ₂ O	1.0
FeSO ₄ *7H ₂ O	5.0
FeCl ₃ *6H ₂ O	0.5
CoCl ₂ *2H ₂ O	0.08
CaCl ₂ *6H ₂ O	47
SeO ₂	0.07
KH ₂ PO ₄	85
KHPO ₄	21.7
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	33.4
NaHCO ₃	1000

Nota: *variable

6.2.2.4.3 Aclimatación y Operación

Una vez que cada RLF operó a estado estable a 10 g/L se cambió la alimentación a una solución de suero de leche con la misma concentración. El suero de leche en polvo tenía las características mostradas en la Tabla 8.

Tabla 8. Características del suero de leche en polvo *

Componente	Concentración
Grasa (%)	0.85
Proteína (%)	12.6
Ceniza (%)	7.58
pH	6.3

*Hegart de México, S.A. de C.V.

6.3 Actividad 2. Superación de la inhibición de la producción de H₂

6.3.1 Propósito

Disminuir el efecto de las bacterias del ácido láctico sobre la producción de H₂.

6.3.2 Diseño experimental y equipamiento del experimento

El diseño experimental consistió en probar dos estrategias para evitar el efecto de las bacterias del ácido láctico, una de ellas fue realizar tratamientos térmicos al lecho, ya que las LAB no pueden esporular (Noike *et al.*, 2002); y la segunda consistió en adicionar NaCl a la solución de suero de leche (SL), ya que se ha observado que esta sal disminuye el efecto de las bacteriocinas sobre algunos microorganismos (Leroy & Vuyst, 1999).

6.3.3 Seguimiento y análisis

El seguimiento y análisis es similar al realizado en la actividad 1.2

6.3.4 Métodos analíticos y procedimientos

Se realizaron dos tratamientos térmicos (tt) al lecho de los RLF. En el primero (SL-1tt) se calentó el lecho a 90° C durante 6 horas, se colocó nuevamente en el reactor y se inició la operación alimentando con suero de leche. En el segundo (SL-2tt) se realizó el calentamiento del lecho a 90° C durante 6 horas y posteriormente se empezó a alimentar con sacarosa durante una semana para después realizar el cambio a suero de leche.

6.4 Actividad 3. Producción de H₂ en lote utilizando suero de leche como sustrato

6.4.1 Actividad 3.1. Estudios presuntivos de producción de H₂ en lote utilizando suero de leche como sustrato

6.4.1.1 Propósito

Observar si se registra producción de H₂ en lote utilizando como inóculo las biopartículas de los RLFA que ya no se encontraban en operación.

6.4.1.2 Diseño experimental y equipamiento del experimento

Se realizaron dos presuntivos, en el primero se evaluó la producción de H₂ en lote a dos temperaturas de incubación: ambiente y 35° C. Se realizó por duplicado y con un control abiótico (inóculo y sustrato esterilizados).

En el segundo experimento (Tabla 9), el diseño experimental fue un factorial 2², en donde se evaluó el efecto de dos factores sobre la producción de H₂: (i) adición de solución amortiguadora de fosfatos (SA); y (ii) la temperatura de incubación, ambiente (15–22° C; promedio 18° C) y 35° C.

Tabla 9. Diseño experimental

Unidad	Temperatura	Tipo de Buffer	pH Inicial
A-NSA		NO	7.39
A-SA	Ambiente	Fosfatos	5.9
M-NSA		NO	7.39
M-SA	35°C	Fosfatos	5.9

6.4.1.1 Seguimiento y análisis

El programa de seguimiento y análisis (Tabla 10) consistió en el seguimiento de la concentración de H₂ y CH₄ en el biogás; pH y ácidos orgánicos en el medio.

Tabla 10. Programa de seguimiento y análisis experimentos en lote

Parámetro	Fase	Fase	Método
	gaseosa	líquida	
Concentración de H ₂ y CH ₄ en el biogás (%)	Diario	NA	1
pH	NA	2-lote	2
Ácidos orgánicos y solventes	NA	2-lote	3

Notas: 1 Cromatografía de gases con detector de conductividad térmica, Valdez-Vazquez *et al.* 2006; 2 Poggi y Rinderknecht, (1989); 3. Cromatografía de líquidos de alta resolución, Valdez-Vázquez *et al.*, 2006.

Las variables de respuesta fueron: la producción acumulada de H₂ (mmol H₂/gST), la velocidad inicial de acumulación de H₂; (mmol H₂ /(gST*h)), el tiempo de retardo de producción de H₂ (h), el cociente A/B (definido anteriormente), y el cociente ρ (definido anteriormente).

6.4.1.2 Métodos analíticos y procedimientos

Los reactores consistieron en viales de vidrio con 60 mL de capacidad y 40 mL de volumen de trabajo, 1 g de inóculo (biopartículas del RLF) y 40 mL de una solución de suero de leche de 10 g/L. Una vez inoculados, los reactores fueron gaseados con N₂ para mantener las condiciones anóxicas e incubados a la temperatura correspondiente.

La fermentación se realizó con venteo interminente (Valdez-Vazquez *et al.*, 2006). Es decir, el biogás en el espacio gaseoso de los reactores fue venteado frecuentemente para mantenerlo a una presión atmosférica de 0.77 atm. Una vez que se alcanzaba la producción acumulada máxima de H₂, el espacio gaseoso fue gaseado con N₂ para sacar el H₂ acumulado. Después, los reactores fueron incubados nuevamente sin adicionar inóculo o más sustrato.

6.4.2 Actividad 3.2. Producción de H₂ en lote utilizando suero de leche como sustrato

6.4.2.1 Propósito

Se realizaron experimentos en lote para obtener la concentración óptima de materia orgánica del suero de leche, pH y temperatura de operación (mesofílica vs temperatura ambiente).

6.4.2.2 Diseño experimental y equipamiento del experimento

El diseño experimental consistió en superficies de respuesta integradas por un factorial 2², con 5 puntos centrales, 4 puntos axiales con $\alpha = 1.414$ con duplicado. (Tabla 11). Se realizaron dos superficies: una a temperatura ambiente y otra a 35° C.

Tabla 11. Niveles de las variables independientes en términos de unidades codificadas y naturales.

Tratamiento	Rango de nivel			
	Codificado		Actual	
	X ₁	X ₂	Concentración de suero de leche (g DQO/L)	pH inicial
1	+	+	35	6.2
2	+	-	35	4.8
3	-	+	10	6.2
4	-	-	10	4.8
5	0	0	22.5	5.5
6	0	0	22.5	5.5
7	0	0	22.5	5.5
8	0	0	22.5	5.5
9	0	0	22.5	5.5
10	+ α	0	40.2	5.5
11	- α	0	4.8	5.5
12	0	+ α	22.5	6.5
13	0	- α	22.5	4.5

6.4.2.3 Seguimiento y análisis

. El programa de seguimiento y análisis es similar al realizado en la actividad 3.1.

Las variables de respuesta empleadas fueron; la producción acumulada de H_2 (mmol H_2 /gST), el cociente A/B (descrito anteriormente), y el cociente ρ (descrito anteriormente).

6.4.2.4 Métodos analíticos y procedimientos

Los reactores consistieron en viales de 60 mL con un volumen de trabajo de 20 mL y 0.5 g de inóculo (biopartículas de los RLF). La fermentación se realizó con venteo intermitente.

Se utilizó como sustrato suero de leche en polvo (del mismo lote que la actividad anterior), como inóculo biopartículas provenientes de un reactor de lecho fluidizado productor de H_2 que fue alimentado con suero de leche como sustrato

6.5 Actividad 4. Estudio de la comunidad microbiana en los experimentos de fermentación oscura

6.5.1 Propósito

Estudiar las comunidades microbianas en reactores de lecho fluidizado usando técnicas de biología molecular, con la finalidad de establecer la posible asociación con el desempeño de los reactores.

6.5.2 Seguimiento y análisis

Se realizó el seguimiento de las comunidades microbianas del efluente del RLF a temperatura ambiente mediante las técnicas de DGGE y de secuenciamiento masivo por semiconductor.

6.5.3 Métodos analíticos y procedimientos

6.5.3.1.1 Toma de muestra

Se llevó a cabo en los tres puertos de muestreo inferiores (Figura 4), se mezcló y se almacenó en tubos Eppendorf estériles en congelación hasta el momento de la extracción de DNA.

6.5.3.1.2 Extracción de ácidos nucleicos totales

La extracción se realizó utilizando el Ultra Clean™ Soil DNA Isolation Kit de MOBIO Laboratories, Inc. Previo a la extracción de DNA se llevó a cabo un pre-tratamiento a la muestra: las biopartículas se molieron con una varilla de vidrio, posteriormente se le adicionó 0.5 mL de agua desionizada y se agitó con un vortex (5 minutos). Finalmente, el líquido se recuperó y se colocó en un tubo limpio.

6.5.3.1.3 DGGE

El seguimiento e identificación de los microorganismos presentes en las muestras por medio de DGGE se realizó como se describe en la Figura 6:

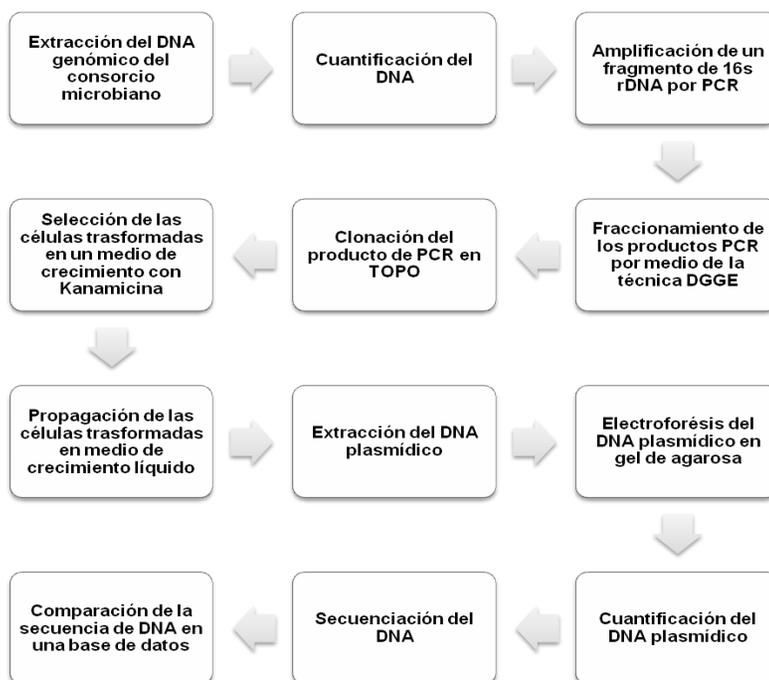


Figura 6. Protocolo de identificación de microorganismos por la técnica de DGGE para el seguimiento de comunidades microbianas

Amplificación por PCR

Para la amplificación por PCR se utilizaron primers específicos para eubacterias: CGO465F (5'-CTC CTA CGG GAG GCA GCA G-3') con pinza de GC y como primer reverso CGO465R (5'-CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG-3') dirigidos para amplificar una región de ≈ 465 pb de la región del gen 16S rDNA. El primer forward se alinea con los nucleótidos 332-350 para el gen de *E. coli* y el primer reverso con los nucleótidos 775-795 del mismo gen.

La composición de la reacción de PCR se muestra en la Tabla 12 y el programa de PCR en la Tabla 13.

Una vez concluidas las reacciones de PCR se realizó el análisis electroforético (50 minutos, 80 V) en un gel de agarosa al 1.5 %, teñido con Midori Green DNA stain, usando como buffer TBE 0.5X. La documentación del gel y la cuantificación del producto de PCR se realizaron como en la actividad anterior.

Tabla 12. Composición de la reacción de PCR eubacterias.

Reactivo	[Stock]	[Rx]	Volumen reacción (25 µl)
H ₂ O	-----	-----	12.9
Buffer (X)	10	1	2.5
MgCl ₂ (mM)	25	4	40
dNTP's (mM)	10	0.2	0.5
CGO465F (µM)	10	0.2	0.5
CGO465R (µM)	10	0.2	0.5
Taq polimerasa (uni/µL)	5	0.025	0.1
DNA (ng/ µl)	-----	0.4	*

Nota: * variable, dependiendo de la concentración de DNA de la muestra

Tabla 13. Programa de reacción de PCR para eubacterias

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Inicio	94	5 min
Desnaturalización	94	30 seg
Alineamiento	55.3	30 seg
Alargamiento	72	30 seg
Extensión final	72	7 min

} 30 ciclos

Fraccionamiento por DGGE

El producto de PCR de cada muestra se fraccionó en un gel de poliacrilamida al 8% (Acilamida:Bisacrilamida 37.5:1), utilizando un gradiente desnaturante de 25:70% . El gel se corrió a 60V durante 20 h, a 60° C, usando TBE 1X como buffer.

En cada pozo del gel se cargaron 18 µg del producto de PCR. El producto de PCR a cargar se mezcló (en relación 1:1 v/v) con buffer de carga 2X. El buffer consistió en 70 % glicerol, 29.98 % TAE 1X y 0.02 % azul de bromofenol. Se utilizaron puntas de capilaridad para colocar la muestra.

Una vez concluidas las 20 h, el gel fue teñido en buffer TBE (0.5X) y SyberGreen® (1:10 000) durante 15 minutos, a continuación se destiñó durante 15 minutos con agua destilada. Finalmente, el gel se documentó en un transiluminador de luz UV.

Recuperación de los productos de PCR del fraccionamiento por DGGE

Ya realizado el fraccionamiento de las muestras por DGGE, se observó el perfil de bandas obtenidas. El criterio de selección de las bandas a escindir se basó en aquellas que se mantenían a lo largo del tiempo y las que aparecían en el punto en el cual se obtenía la mayor producción de H₂.

Una vez seleccionadas las bandas de interés, se realizaron más reacciones de PCR para obtener 120 µg de producto de PCR para el gel preparativo. El gel preparativo consistió en un gel de poliacrilamida al 8 % (Acrilamida:Bisacrilamida 37.5:1) utilizando un gradiente desnaturante de 25:70 %, con un pozo para producto de PCR de *E. coli*, uno para la muestra a utilizar (como patrón) y un diente del tamaño de 8 pozos para la muestra con las bandas a cortar. El teñido y desteñido se realizó como en el fraccionamiento por DGGE, posteriormente se cortaron las bandas de interés y se colocaron en tubos de 1.5 mL.

Obtención del DNA del gel de las bandas cortadas

Las bandas cortadas fueron a continuación electroeluidas, en un equipo de electroelución (Cinvestav, México). La cámara de electroelución fue llenada con una solución TBE 1X. Cada codo del pozo contuvo 100 µL de una solución de acetato de sodio 3 M (pH 4.8) mezclado con 2 µl de azul de bromocresol. En el pozo se colocó el gel con el DNA de cada banda cortada. La electroelución se realizó a 120 V, durante 20 minutos.

Del codo de cada pozo se tomaron 500 µL de la solución y se le realizó extracción de DNA por medio de la técnica de fenol/cloroformo. La técnica consistió en los pasos siguientes:

1. Adicionar 500 µL de fenol equilibrado y 500 µL de cloroformo, centrifugar durante 15 minutos a 13 000 rpm y 10° C.
2. Tomar el sobrenadante y colocar en un tubo nuevo (eppendorf de 1.5 mL).

3. Adicionar 1 000 μ L de etanol absoluto y centrifugar 30 minutos a 13 000 rpm y 10° C.
4. Desechar el sobrenadante, adicionar 500 μ L de etanol al 70 % y centrifugar 15 minutos (13 00 rpm, 10° C)
5. Desechar el sobrenadante y dejar secar la pastilla.
6. Resuspender en 20 μ L de agua

Una vez realizada la extracción se cuantificó y se realizó electroforesis en un gel de agarosa al 1% para corroborar la presencia de DNA. Se almacenó a -20° C.

Clonación

El DNA recuperado de las bandas cortadas se clonó en un vector de clonación pJET1.2 (Fermentas). El procedimiento que se siguió fue el indicado por el manual del fabricante.

El vector de clonación (Figura 7) consiste de un plásmido de 2974pb con sitios de clonación múltiple a extremos romos, genes de auto-lisis (Eco471R). Contiene genes que confieren resistencia a Ampicilina (bla (ApR)), por lo que la selección de las clonas fue por selección positiva.

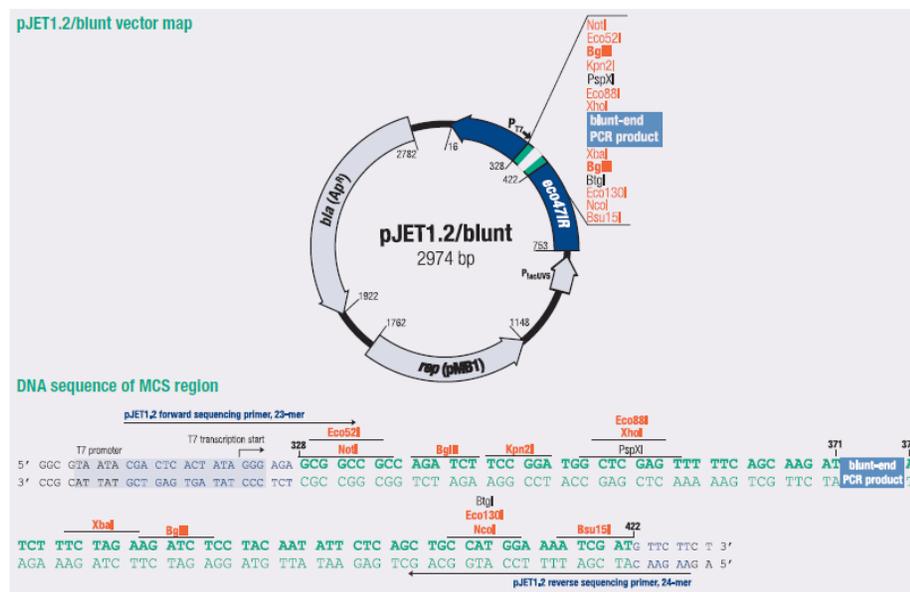


Figura 7. Vector de clonación pJET 1.2

Generación de células competentes

Se tomaron varias colonias de un cultivo joven de *E. coli* TOP10F' crecido en medio LB sólido y se crecieron en 50 mL de LB (medio líquido) a 37° C y agitación de 200 rpm. Una vez que se llegó a una densidad óptica de 0.2-0.4, el cultivo se empastilló en tubos estériles (Falcon) de 50 mL mediante centrifugación (2 minutos a 7000 rpm). Posteriormente, la pastilla se resuspendió en 5 mL de una solución de CaCl₂ 0.1 N y se centrifugó durante 5 minutos a 7000 rpm. Se recuperó nuevamente la pastilla para a continuación resuspenderla en 1000 µL de CaCl₂ y se hicieron alícuotas de 200 µL en tubos de plástico de 1.5 mL (Eppendorf).

Reacción de ligación

La reacción de ligación se realizó como se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Reacción de ligación.

Reactivo	Concentración	Cantidad (µl)
Agua libre de nucleasas	Pura	4
Buffer de reacción	2X	10
Producto de PCR	Variable	4
DNA blunting enzyme		1

Colocar en un vortex brevemente y centrifugar 3-5 segundos.
Incubar la mezcla a 70° C durante 5 minutos, ponerlo brevemente en hielo

pJET 1.2 /blunt cloning vector	50 ng/µL	1
T4 DNA ligasa	5 U/ µL	1

Transformación

A 200 µL de células competente se adicionaron 20 µL de la reacción de ligación y se incubaron 30 minutos en hielo. A continuación, se colocó a 42° C durante 90 segundos y se incubó en hielo durante 2 minutos. Se adicionó 800 µL de LB (precalentado a 37° C) y se incubó a 37° C por 45 minutos.

Una vez transcurridos los 45 minutos, se espatularon 200 μL en cajas de medio sólido de LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se dejaron en incubación (37° C) toda la noche. Después de las 24 h de incubación se observó crecimiento de colonias y se aislaron 6 colonias de cada banda clonada.

Extracción del DNA plasmídico

La extracción del DNA plasmídico se llevó a cabo por la técnica de lisis alcalina. Se inocularon 5mL de medio LB con ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con colonias de bacterias transformadas y se incubó a 37° C y 200 rpm durante 3 horas.

El cultivo se empastilló en tubos de 1.5 mL mediante centrifugación (2 minutos, 7 000 rpm). El sobrenadante se desechó, la pastilla fue resuspendida en 150 μL la Solución I [Glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 Mm (pH 8.0), EDTA 10 mM (pH 8.0)] y colocada en hielo por 5 minutos. Posteriormente, se adicionó 100 μL de la solución II (NaOH 0.2N, SDS 1 %) que fue preparada al momento, se mezcló y se colocó en hielo durante 5 minutos. Se adicionó 200 μL de la Solución III [60 mL de acetato de potasio 5M, 11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5 mL de agua], se mezcló y se incubó 5 minutos en hielo.

Una vez agregadas las 3 soluciones de lisis, se centrifugaron (12 000 rpm, 4° C) los tubos por 5 min y se recuperaron 450 μL del sobrenadante. Al sobrenadante recuperado se le adicionó RNAsa A (concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, se llevó acabo una extracción del DNA usando la técnica Fenol-Cloroformo. El DNA extraído fue observado en un gel al 1 % y cuantificado.

Confirmación por PCR

Con el DNA plasmídico extraído se realizó una reacción de PCR (Tablas 15 y 16), usando como primers los provenientes del Kit de clonación.

Tabla 15. Composición de la reacción de PCR confirmatoria

Reactivo	[Stock]	[Rx]	Volumen reacción (25 µl)
H ₂ O	-----	-----	12.9
Buffer	10X	1X	2.0
MgCl ₂	25mM	2 mM	1.6
dNTP's	10mM	0.2 mM	0.4
Taq polimerasa	5 uni/µL	0.025 uni/µL	0.1
pJET 1.2 F	10µM	0.2 µM	1.0
pJET 1.2 R	10µM	0.2 µM	1.0
DNA	-----	100 ng	1

Tabla 16. Programa de reacción de PCR confirmatoria

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Inicio	95	3 min
Desnaturalización	94	30 seg
Alineamiento	60	30 seg
Alargamiento	72	45 seg
Extensión final	72	10 min

} 25 ciclos

6.5.3.1.4 Secuenciamiento masivo por semiconductor de una genoteca de 16S rDNA

Se realizaron reacciones de PCR con el DNA previamente extraído. Los primers usados fueron dirigidos para amplificar la región V3 del 16S rDNA. El primer forward fue V3-341F con 12bp Golay barcode (Fierer *et al.*, 2008) y adaptadores para el secuenciamiento masivo; el primer reverso fue V3-518R que contiene adaptadores A y P1 truncado (Whiteley *et al.*, 2012).

La mezcla de PCR consistió en: (i) 1X Buffer, (ii) 2 mM MgCl₂, (iii) 0.2 mM dNTP's, (iv) 0.025 U/µL Taq DNA, (v) 0.2 µM of each primer, y (vi) 10 ng de DNA como molde. El programa de la reacción de PCR se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17. Programa de reacción de PCR confirmatoria

Etapas	Temperatura (° C)	Tiempo	
Inicio	95	5 min	
Desnaturalización	94	15 seg	} 30 ciclos
Alineamiento	62	15 seg	
Alargamiento	72	15 seg	
Extensión final	72	10 min	

El producto de PCR (263 pb) fue purificado por medio de separación electroforética en un gel de agarosa al 2 %, y con el kit Wizard SV Gen PCR Clean-Up System (Promega). La cuantificación del producto de PCR se realizó en un espectrofotómetro NanoDrop (ThermoScientific).

Una vez purificados y cuantificados, los productos se mandaron a la preparación de la librería y al secuenciamiento en un equipo Ion Torrent PGM. Se usó un Chip 316 y un kit Ion Sequencing 200 bp (Life Technologies) de acuerdo a los protocolos estándares (Ion Xpress_ Plus gDNA and Amplicon Library Preparation, Life Technologies).

Los resultados obtenidos se filtraron por medio de un software PGM para eliminar secuencias con baja calidad y policlonales. El demultiplex de los resultados se realizó por medio del software Sequenced data-Microbiota analysis Ion torrent PGM software, Torrent_Suite v 4.0.2. El análisis posterior se realizó en el programa QIIME version 1.8.0.

6.5.4 Índices de riqueza y uniformidad

Para medir la biodiversidad se usan dos aspectos de la diversidad: (i) la riqueza o el número de filotipos en una comunidad, y (ii) la abundancia relativa (uniformidad, o dominancia) que toma en cuenta el número de individuos por filotipo (Ricotta & Avena, 2003).

Estos aspectos de la diversidad son plasmados mediante el uso de varios índices de diversidad. Algunos de los usados para la estimación de la variación intra y entre

etapas en el DGGE, son: (i) índice de Jaccard (IJ); (ii) índice discreto de divergencia de Poggi (Δ_P) y (iii) el coeficiente dinámico de convergencia de Poggi ($\dot{\Delta}_P$).

El índice de Jaccard tiene un rango de 0 a 1; 1 cuando los perfiles de la comunidad son completamente similares y 0 cuando los perfiles son completamente distintos (Zárate-Segura *et al.*, 2005). El IJ se calcula como se indica en la Ec. 7.

$$IJ = \frac{n_{AB}}{(n_A + n_B - n_{AB})} \quad (7)$$

dónde:

n_{AB} = número de bandas que están presentes en la línea A y B

n_A = número total de de bandas en la línea A

n_B = número total de bandas en la línea B

El índice discreto de divergencia de Poggi varía entre 0 y 1; 0 indica perfiles similares y 1 perfiles completamente diferentes (Ec. 8; Poggi-Varaldo *et al.*, 2012):

$$\Delta_P = \frac{(n'_A + n'_B)}{(n_A + n_B)} \quad (8)$$

dónde:

n'_A = número de bandas de la línea A ausentes en B

n'_B = número de bandas de la línea B ausentes en A

n_A = número total de de bandas en la línea A

n_B = número total de bandas en la línea B

El coeficiente dinámico de divergencia (Ec.9), indica el cambio en la riqueza de la comunidad con respecto al tiempo, mostrando la estabilidad de la riqueza (Poggi-Varaldo *et al.*, 2012). Un valor bajo indica que la comunidad microbiana es relativamente estable con respecto al tiempo.

$$\dot{\Delta}_P = \frac{d\Delta_P}{dt} \quad (9)$$

Los resultados del secuenciamiento masivo se analizaron usando los índices de Shannon-Weaver y de Pielou's.

El índice de Shannon-Weaver (Shanon, 1948) se define como en la Ec. 10:

$$H' = \sum_{i:1}^S (p_i \log p_i) \quad (10)$$

dónde:

p_i : es la proporción de individuos pertenecientes a una especie i en el grupo de datos de interés,

S: es el número total de especies.

El índice de uniformidad de Pielou (Ec. 11) cuantifica qué tan similar numéricamente es la comunidad (Pielou, 1966). El índice se define cómo:

$$J' = \frac{H'}{\log S} \quad (11)$$

dónde

H' = es el índice Shannon-Weaver

S= es el número total de especies

El índice se encuentra entre 0 y 1; 1 indica el máximo de uniformidad o la distribución equitativa de las especies.

Se calculó el Ω para medir que tan cercano o separado filogenéticamente se encontraba la diversidad de la comunidad. Primero, se estimó el índice de Shannon-Weaver con los resultados por fila (H'_ϕ) y género (H'_g). Después se calculó la raíz cuadrada del producto entre H'_ϕ y H'_g :

$$H'_\Phi = \sum_{\Phi:1}^S (p_\Phi \log p_\Phi) \quad (12)$$

donde:

p : is la proporción de individuos pertenecientes a un filo i de un grupo de datos de interés.

S: es el número total de fila

$$H'_g = \sum_{g:1}^S (p_g \log p_g) \quad (13)$$

dónde:

p : is la proporción de individuos pertenecientes a un género i de un grupo de datos de interés.

S: es el número total de géneros

$$\Omega = \sqrt{H'_\Phi * H'_g} \quad (14)$$

Se puede observar que siempre el valor de $\Omega \leq H'_g$, esto significa que el H'_Φ actúa en dirección de la disminución de la diversidad. El Ω puede capturar las diferencias filogenéticas en adición a las diferencias de secuencias o género (Poggi-Varaldo, 2014).

6.6 Actividad 5. Estudios del potencial hidrogenogénico fotoheterotrófico de los licores fermentados

6.6.1 Propósito

Determinar si existe producción de hidrógeno utilizando el efluente de la fermentación oscura del suero de leche de la actividad 1.2 (del RLF a temperatura ambiente).

6.6.2 Diseño experimental y equipamiento del experimento

El diseño experimental consistió en la comparación de la producción de H₂ obtenida utilizando *R. palustris* y un cultivo mixto de BPNS, utilizando el SLF de forma directa y con una dilución 1:2. Como control se utilizó el medio Pfenning modificado. Se tuvo un control de H₂ basal que consiste de inóculo y agua de la llave.

6.6.3 Seguimiento y análisis

En la Tabla 18 se muestra el programa de seguimiento y análisis.

Tabla 18. Programa de seguimiento y análisis de producción fotoheterótrofa de H₂

Parámetro	Fase gaseosa	Fase líquida	Método
Concentración de H ₂	1/24 h	NA	1
Metabolitos orgánicos volátiles y solventes	NA	2-lote	2
pH	NA	2-lote	3
Nitrógeno Kjeldahl y amoniacal	NA	2-lote	3
Sólidos suspendidos volátiles (mg/L)	NA	2-lote	3

1. Cromatografía de gases con detector de conductividad térmica; 2. Cromatografía de gases.; 3. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1987); NA: no aplica

Las variables de respuesta empleadas fueron: la producción acumulada de H₂ (mmol H₂/gST), el cociente A/B (definido anteriormente), y el cociente ρ (definido anteriormente).

6.6.4 Métodos analíticos y procedimientos

Como fotobiorreactor se utilizaron botellas serológicas de 60 mL con un volumen de operación de 40 mL incubadas a 32° C anaeróticamente, con una intensidad luminosa de 3 Klux y argón en la fase gaseosa.

La fase líquida se operó en lote y la fase gaseosa de manera intermitente (después de cada muestreo de biogás se gaseó con Argón; Acevedo-Benitez, 2008). El cultivo mixto de BPNS (recuperado por Robledo- Narváez 2011) y *R. palustris* se mantuvieron en medio Pfenning modificado (Acevedo-Benitez, 2008). El inóculo se adicionó al 10 % (V/V). El sustrato consistió en el efluente de fermentación oscura del suero de leche.

6.7 Actividad 6. Evaluación de la producción de H₂ a partir de la fermentación oscura de la mezcla de sustratos (SL-FORSU) en FASSH-VI

6.7.1.1 Propósito

Evaluar la producción de H₂ de la co-fermentación de suero de leche- fracción orgánica de los residuos urbanos (SL-FORSU).

6.7.1.2 Diseño experimental y equipamiento del experimento

El diseño experimental consistió en la fermentación en sustrato sólido con venteo intermitente (FASSH-VI) utilizando diversas mezclas de sustrato SL-FORSU. Las diferentes mezclas y la relación carbono- nitrógeno (C/N) de cada mezcla se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Programa de seguimiento y análisis experimentos de co-fermentación SL-FORSU

Concentración de sustrato (%)		C/N
FORSU	SL	
*100	0	35
70	30	23
50	50	21
30	70	20
**0	100	19.6

Notas: *Control 1: solo FORSU; **Control 2: solo SL

6.7.1.3 Seguimiento y análisis

El programa de seguimiento y análisis se realizó como se muestra en la Tabla 20.

Tabla 20. Programa de seguimiento y análisis de co-fermentación de sustratos

Parámetro	Fase gaseosa	Fase sólida	Método
Concentración de H ₂	Diario	NA	1
Metabolitos orgánicos volátiles y solventes	NA	2-lote	2
pH	NA	2-lote	3

1. Cromatografía de gases con detector de conductividad térmica; 2. Cromatografía de gases.; 3. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1987); NA: no aplica

Las variables de respuesta empleadas fueron; la producción acumulada de H_2 ($mmol H_2/gST$), el cociente A/B (definido anteriormente), y el cociente ρ (definido anteriormente).

6.7.1.4 Métodos analíticos y procedimientos

Se realizó una fermentación FASSH-VI, usando como sustrato una mezcla de SL-FORSU. La FORSU consistió de 60 % de residuos de vegetales y frutas obtenidos del mercado de la localidad, y 40 % de residuos de papel de oficina. Como inóculo se usaron los sólidos de un digestor anaerobio en sustrato sólidos metanogénico (tratados térmicamente; 90° C, 4 h). Los reactores consistieron en botellas de vidrio de 240 mL, el espacio gaseoso usado fue de 200 mL, se utilizó 10 g de inóculo y 40 g de sustrato húmedo (25 % de sólidos totales).

7 Resultados

7.1 Actividad 1. Estudios preliminares del potencial hidrogenogénico del suero de leche en fermentación anaerobia

7.1.1 Actividad 1.1 Arranque y operación de reactores anaerobios metanogénicos (DAM)

En la Figura 8 se muestra el desempeño de los digestores anaerobios metanogénicos (DAM). Se operaron los primeros 60 días con un tiempo de retención másico que fue disminuyendo desde 100 hasta llegar a 21 días, esto con la finalidad de evitar sobrecarga orgánica en los rectores que ocasionara la desviación de la metanogénesis hacia la generación de hidrógeno.

En la Figura 8a se muestra el desempeño de los reactores anaerobios metanogénicos y se puede observar que los primeros 60 días se obtuvo una productividad de biogás (volumen de biogás producido por gramo de sólido total por volumen de lecho por día) menor a 1600 NmL.

A partir del día 60 se inició la alimentación con un TRM de 21 d (Valdez-Vázquez *et al.*, 2006a). Ese mismo día la alimentación se cambió y se usó la fracción orgánica de los residuos orgánicos (FORSU), para mantener la concentración de ST en un 10 % (Figura 8c). En la Figura 8b se puede observar que el metano se mantuvo en el valor esperado $\geq 50\%$, el pH superior a 7 (Figura 8e) y el parámetro alfa menor a 0.5 (Figura 8f).

En cuanto al rendimiento de remoción de DQO (Figura 8d) se puede observar que a partir del día 70 se obtienen rendimientos ≥ 50 . Esto aunado a la estabilidad del pH, concentración de metano en el biogás, y el parámetro alfa < 0.5 indicó que ya se podía utilizar la biomasa de los DAM como inóculo de los reactores de lecho fluidizado (Poggi-Varaldo *et al.*, 1997 b).

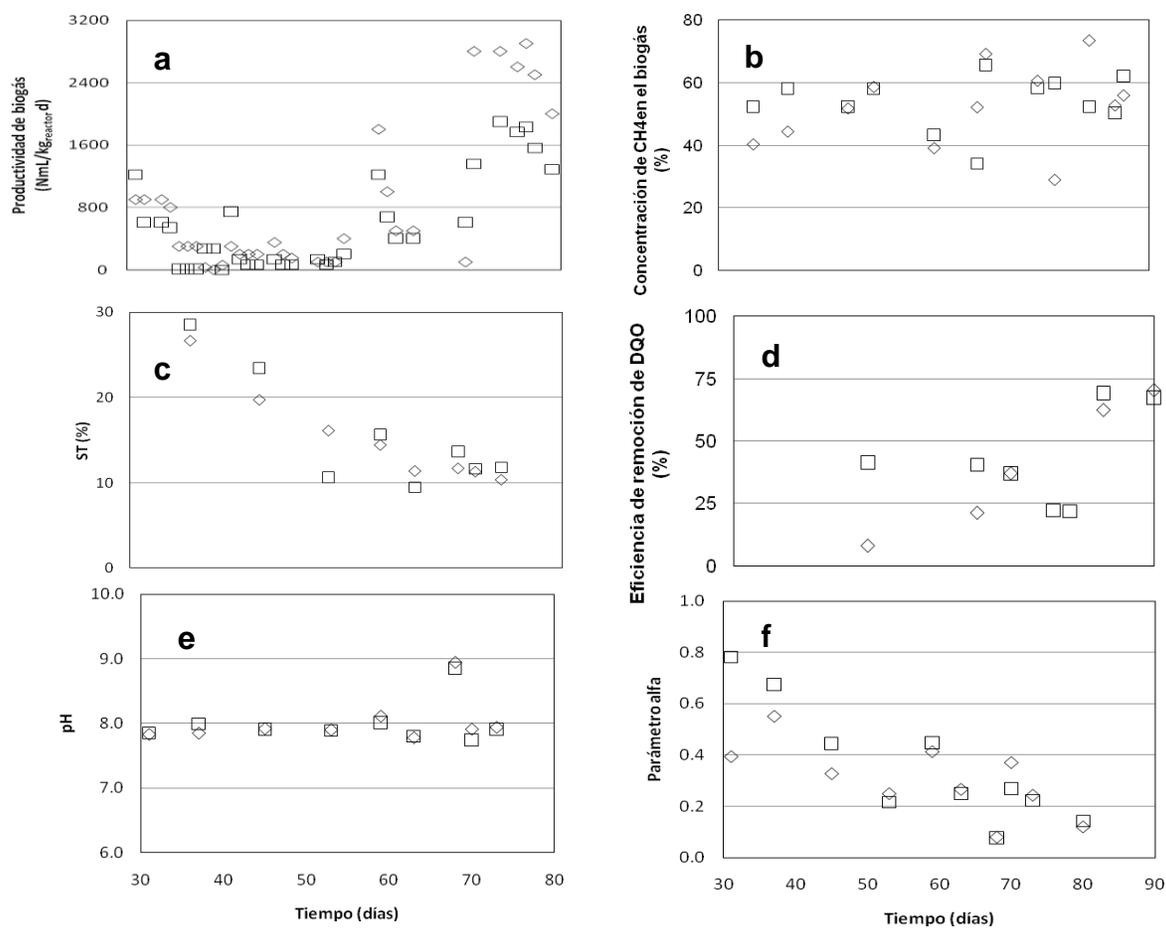


Figura 8. Seguimiento del desempeño de reactores anaerobios metanogénicos: a) rendimiento de producción de biogás; b) concentración de metano en el biogás; c) concentración de sólidos totales; d) eficiencia de remoción de DQO; e) pH y f) parámetro alfa. \diamond DAM1 y \square DAM2

7.1.2 Actividad 1.2 Arranque y operación reactores anaerobios de lecho fluidizado (RLF).

Los resultados se analizaron en dos secciones para ambas temperaturas (ambiente y 35°C): (i) operación con sacarosa con una carga volumétrica de 5-8 g/L_{lecho}*día y (ii) el cambio de la operación con 10 g/L_{lecho}*día de sacarosa a 10 g/L_{lecho}*día de SL.

7.1.2.1 Operación con sacarosa con una carga volumétrica de 5-8 g/L_{lecho}d

7.1.2.1.1 Efecto del incremento de la carga volumétrica

Con el incremento de la carga orgánica, de 5 a 8 g /L_{lecho}*día, se observó un mejor desempeño de los reactores (Figura 9); obteniéndose de 5-6 veces mayor producción de H₂ (a ambas temperaturas).

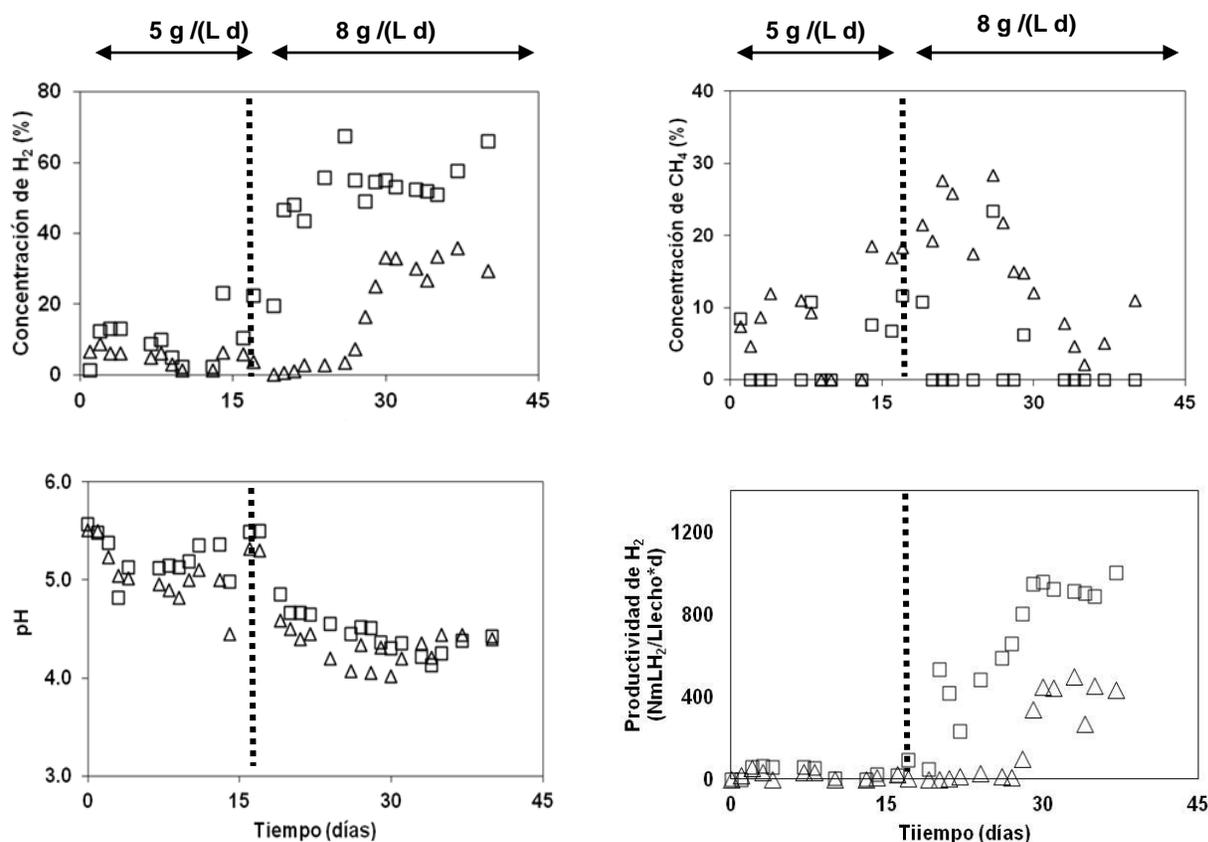


Figura 9. Dinámicas de: (a) concentración de H₂ en el biogás; (b) concentración de CH₄ en el biogás; (c) pH; y (d) productividad de H₂. □: RLF-A; △: RLF-M. Notas: líneas punteadas indican el cambio de Bv=5 g sacarosa/L_{lecho}*día a 8 g sacarosa/L_{lecho}*día.

Al inicio del periodo con 8 sacarosa/Llecho*día no se observó producción de H₂ pero sí de CH₄ (Figuras 1 a & b), esto va de acuerdo con lo reportado de que la metanogénesis consume H₂ (Oh *et al.*, 2003).

La presencia de CH₄ pudo indicar que el tratamiento térmico no fue efectivo para eliminar a los microorganismos que no son capaces de esporular, como las arqueas metanogénicas (productoras de CH₄; Mohan *et al.*, 2008). Por lo que se dejó de adicionar bicarbonato en el agua sintética para así permitir la disminución del pH en los reactores. El pH disminuyó hasta 4.5 y con esto la concentración de CH₄ en el biogás.

En cuanto a los metabolitos detectados (Tabla 21), fueron: ácido acético (HAc), ácido butírico (HBu), ácido propiónico (HPr), etanol (EtOH) y butanol (BuOH). En ambas temperaturas se observaron relaciones altas de ρ , lo que indica que los ácidos orgánicos volátiles predominaron en la suma de los productos microbianos solubles.

Tabla 21. Productos microbianos solubles generados en RLF-A y RLF-M

Productos microbianos solubles (PMS;mgDQO/L)	Bv = 5 g sacarosa/(L.d)		Bv = 8 g sacarosa/(L.d)	
	RLF-A	RLF-M	RLF-A*	RLF-M*
Ácido acetic	1 101 ± 238	951 ± 110	957 ± 236	1 172 ± 196
Ácido propiónico	782 ± 180	1024 ± 325	318 ± 32	341 ± 69
Ácido butírico	838 ± 164	1 403 ± 372	2 097 ± 427	1 382 ± 321
Ácido lactic	ND	ND	ND	ND
Acetona	ND	ND	ND	ND
Metanol	ND	ND	ND	ND
Etanol	106 ± 72	53 ± 28	88 ± 18	1655 ± 50
Butanol	31 ± 15	ND	89 ± 11	68 ± 7
EtOH/PMS (%)	0.8 ± 1	2 ± 1	2 ± 0	36 ± 4
BuOH/PMS (%)	1 ± 0.3	-----	3 ± 0	1 ± 0
HAc/PMS (%)	40 ± 3	29 ± 18	27 ± 3	25 ± 1
HPr/PMS (%)	28 ± 2	40 ± 10	9 ± 2	7 ± 0
HBu/PMS (%)	30 ± 3	30 ± 19	59 ± 2	30 ± 3
A/B	1 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.9 ± 0.1
AOVT (mg DQO/L)	2 722 ± 312	2 595 ± 818	3 372 ± 650	2 897 ± 59
PMS (mg DQO/L)	2 771 ± 277	2 630 ± 849	3 550 ± 676	4 621 ± 643
AOVT/SOLV	55	72	19	1.2

*Los resultados promedio se tomaron bajo condiciones de estado estable: RLF-A: días 8-22 y RLF-M: días 15- 22. A/B: relación ácido acético-ácido butírico. EtOH: etanol; BuOH: butanol; HAc: acetato; HPr: propionato; HBu: butirato; AOVT: ácidos orgánicos volátiles totales= HAc+HPr+HBu; PMS: productos microbianos solubles=AOVT+EtOH+BuOH. En bas: DQO/L

En el segundo periodo de operación la relación ρ en RLF-A fue casi 16 veces superior que la determinada para el RLF-M. Esto fue consistente con el incremento en

la producción de etanol, debido probablemente al bajo pH, ya que valores menores de 4.5 son asociados a la desviación de la producción de H₂ hacia la solventogénesis (Hawkes *et al.*, 2002).

7.1.2.1.2 Efecto de la temperatura de operación

Se observó mejor desempeño en el RLF-A que en el RLF-M (Figura 9 d), mostrando una productividad 2.1 veces superior a temperatura ambiente que a 35 °C. (1 232 y 589 NmLH₂/(L_{lecho} d), respectivamente).

Estos resultados se encuentran en concordancia con lo obtenido por Gadhamshetty *et al.* (2009), con la cautela que ellos trabajaron en lote y en este trabajo nosotros en continuo. Gadhamshetty *et al.* (2009) realizaron la producción de H₂ en un reactor de mezcla completa a 22 °C y 37 °C, observando una producción 30% mayor en los reactores operados a 22°C. Ellos atribuyen ese resultado a que la temperatura más baja induce cinéticas más lentas y esto permite que los microorganismos productores de H₂ tengan más tiempo de adaptarse al cambio en el pH.

La temperatura de operación también influyó la relación ρ . El ρ de RLF-M fue 11.3 veces menor que RLF-A en el segundo periodo de operación. De manera interesante, se puede ver que a pesar de que los dos reactores se mantuvieron a valores bajos similares de pH, no se observó producción de solventes en RLF-A. Esto pudo deberse a lo comentado anteriormente, que la baja temperatura les permitió a los microorganismos mayor tiempo de adaptarse a las condiciones del medio y el bajo pH no afectó en la misma medida que a una temperatura mayor.

7.1.2.2 Cambio de la operación con 10 g /L_{lecho}*día de sacarosa a 10 g /L_{lecho}*día de suero de leche

7.1.2.2.1 Efecto del incremento de la carga volumétrica

Los reactores fueron operados durante 30 días con una carga orgánica volumétrica (Bv) de 10 g sacarosa/L_{lecho}*día. La productividad de H₂ obtenida en el RLF-A fue de 1011 NmL H₂/L_{lecho}día y en el RLF-M de 1 115 NmL H₂/L_{lecho}*día (Tabla 22).

Tabla 22. Desempeño promedio de los RLF-A y RLF-M con 10 g/L_{lecho}*día de sacarosa y de suero de leche

Parámetro	RLF-A		RLF-M	
	Sacarosa (S)	Suero de leche (SL)	Sacarosa (S)	Suero de leche (SL)
pH	4.27 ± 0.12	4.31 ± 0.07	4.20 ± 0.20	4.32 ± 0.08
Concentración de H ₂ (%)	39.4 ± 8.5	11.8 ± 1.6	41.71 ± 12.9	15.18 ± 10.44
Productividad de H ₂ (NmL H ₂ /L _{lecho} día)	1 011 ± 339	101 ± 25	1 115 ± 767	159 ± 143

Se puede observar que la relación ρ obtenida a temperatura ambiente fue baja (Tabla 23), lo que indica que existió una alta concentración de solventes en el efluente y que la fermentación se podía estar desviando a la producción de solventes. En efecto, más del 24% de los productos microbianos soluble fueron solventes, y de estos el principal fue etanol. Es conocido que la fermentación etanólica está relacionada con bajas producciones de H₂ (Koskinen *et al.*, 2007).

Con el cambio de sustrato a suero de leche, la productividad disminuyó en más de 10 veces a ambas temperaturas. En esta etapa, se detectó ácido láctico en el efluente, y esto pudo indicar la presencia de bacterias del ácido láctico (LAB, Noike *et al.*, 2002). Este tipo de bacterias se encuentran relacionadas con bajas producciones de H₂ (Noike *et al.*, 2002; Escamilla-Alvarado *et al.*, 2012) como resultado de una combinación de competencia por el sustrato y de los efectos inhibitorios de las LAB's sobre los microorganismos productores de H₂.

Tabla 23. Productos microbianos solubles de RLF-A y RLF-M con 10 g/L_{lecho}-día de sacarosa y de suero de leche

Parámetro	RLF-A		RLF-M
	Sacarosa (S)	Suero de leche (SL)	Sacarosa (S)
Ácido acético	885 ± 362	289 ± 149	1350 ± 1436
Ácido propiónico	282 ± 140	14.2 ± 13.7	637 ± 225
Ácido butírico	4 392 ± 1 570	299 ± 28	2844 ± 549
Ácido láctico	ND	0.07 ± 0.02	ND
Acetona	ND	ND	ND
Metanol	ND	ND	ND
Etanol	1193 ± 822	117 ± 67	2423 ± 1436
Butanol	477 ± 98	77 ± 12	174 ± 40
EtOH/PMS (%)	17 ± 11	14 ± 5	32 ± 16
BuOH/PMS (%)	7 ± 2	10 ± 1	2 ± 1
HAc/PMS (%)	12 ± 3	35 ± 9	18 ± 3
HPr/PMS (%)	4 ± 2	2 ± 1	9 ± 4
HBu/PMS (%)	60 ± 7	39 ± 14	39 ± 10
A/B	0.20 ± 0.02	1.0 ± 0.6	0.49 ± 0.14
AOVT (mg DQO/L)	5 559 ± 2027	602 ± 135	4836 ± 696
PMS (mg DQO/L)	7 229 ± 2 320	796 ± 215	7432 ± 800
ρ, AOVT/SOLV	4 ± 3	3 ± 1	2 ± 2

Notas: A/B: relación ácido acético-ácido butírico. EtOH: etanol; BuOH: butanol; HAc: acetato; HPr: propionato; HBu: butirato; AOVT: ácidos orgánicos volátiles totales= HAc+HPr+HBu; PMS: productos microbianos solubles=AOVT+EtOH+BuOH. En bas: DQO/L. ND: no detectado

Existen tres mecanismos que pueden explicar los efectos antimicrobianos de las LABs: (i) incremento en la concentración de ácidos orgánicos, lo que puede causar una rápida acidificación del medio (Daeschel, 1989); (ii) competencia por los nutrientes (Noike *et al.*, 2002); y (iii) producción de compuestos antimicrobianos (Jay, 1982; Klaenhammer, 1988). Noike *et al.* (2002) investigaron los efectos de las LAB sobre la producción fermentativa de H₂ y observaron que el principal efecto es la excreción de bacteriocinas.

Las bacteriocinas son proteínas que tiene actividad sobre las bacterias gram positivas, entre las que se encuentran *Clostridium* y algunos patógenos que se encuentran en los alimentos (Cotter *et al.*, 2005; De Vuyst & Vandamme, 1994; Klaenhammer, 1988; Nettles & Barefoot, 1993). Las bacteriocinas atacan la membrana celular de otras bacterias, con lo que se evita su reproducción (Moreira & Wagner, 1993).

En este trabajo se le realizó un tratamiento térmico al inóculo para eliminar a microorganismos consumidores de H_2 , como son las arqueas metanogénias y las LAB's, que son microorganismos que no pueden esporular (Azbar *et al.*, 2009; Noike *et al.*, 2002). Pero debido a la presencia de metano en actividades pasadas y a la de ácido láctico, tal parece que el tratamiento térmico no fue efectivo, por lo que se buscaron alternativas para disminuir el efecto de la presencia de LABs.

7.1.2.2.2 Efecto de la temperatura de operación

Se obtuvieron productividades de H_2 similares a ambas temperaturas, pero se puede observar en la Tabla 22 que las desviaciones a temperatura mesofílica fueron mayores, lo que indica mayor inestabilidad que a temperatura ambiente.

7.2 Actividad 2. Superación de la inhibición de la producción de H₂.

Una vez que se determinó que el tratamiento al inóculo no fue suficiente se decidió realizar un primer tratamiento térmico al lecho de los reactores, igual a 90° C pero ahora por 6 horas. Posterior al tratamiento térmico se inició la operación con 10 g/L_{lecho}*día de suero de leche (SL-1tt). No se detectó H₂ a ninguna de las temperaturas de operación.

Se realizó un segundo tratamiento térmico pero ahora se inició la operación con sacarosa y se cambió a suero de leche (SL-2tt), pero no se detectó producción de H₂.

Para corroborar la presencia de LABs en el sistema, se tomó una muestra de las biopartículas y se sembraron en medio MRS (agar formulado para evidenciar el crecimiento de *Lactobacilli* y otras LABs; De Man *et al.*, 1960), observándose crecimiento en las muestras de ambos reactores.

El crecimiento de colonias indicó que el tratamiento térmico no había eliminado a las LABs. Esto pudo deberse a que los microorganismos en la biopelícula fueron protegidos de las condiciones ambientales debido a la partícula. La temperatura en la parte más interna de la biopartícula, que es en donde se concentrarían los microorganismos anaerobios (McLeod *et al.*, 1990; Shida *et al.*, 2009), es menor que aquella en la superficie de la biopartícula.

Como no se consiguió eliminar a las LABs se buscó otra alternativa para disminuir su efecto. Se ha reportado que el uso de algunas sales, como es el NaCl, puede reducir el efecto de las bacteriocinas. Por lo tanto, se probó una segunda estrategia que consistió en realizar un nuevo tratamiento térmico, pero ahora se adicionó 1 g/L de NaCl al influente de los reactores.

Se inició la operación con sacarosa durante 5 días y luego se cambió a SL (B_v=10 g/L_{lecho}*día). No se detectó H₂ con solo el SL, pero una vez que se adicionó el NaCl se observó que la producción de H₂ inició inmediatamente (Figura 10 a), con una concentración de H₂ de cerca del 20% (Figura 10 b). Después de 20 días, la producción se detuvo y se volvió a realizar un tratamiento térmico para después operar con SL-NaCl pero ahora con una B_v= 5 g/L_{lecho}.día, para observar si con una Bv menor se podía mantener por más tiempo la producción de H₂ (Figura 10 a y b).

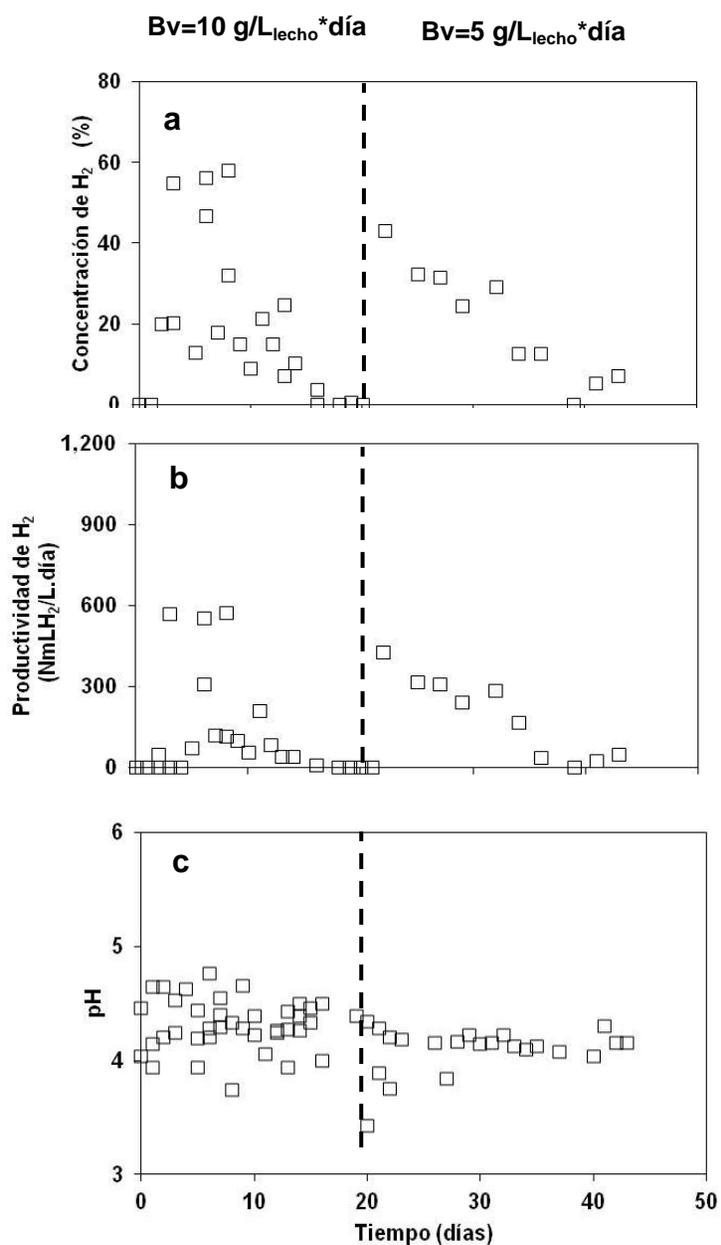


Figura 10. Dinámicas del RLF-A: (a) concentración de H₂ en el biogás; (b) productividad de H₂; (c) pH. Nota: líneas punteadas indica cambio a una Bv= 5 g/L_{lecho}*día de SL.

. La productividad con SL-NaCl (Bv= 10 g/L_{lecho}.día) se vio incrementó casi 3 veces comparada con el valor obtenido con suero de leche pero sin NaCl (Tabla 24) y se observó una reducción en la concentración de ácido láctico.

En la operación con SL-NaCl pero Bv= 5 g/L_{lecho}.día la productividad promedio fue de cerca de 2 veces de lo obtenido con solo suero de leche. La producción se detuvo alrededor del día 32 de operación.

Tabla 24. Desempeño promedio de los RLF-A y RLF-M con 10 y 5 g/L_{lecho} *día de suero de leche y NaCl

Parámetro	Suero de leche (g/L _{lecho} *día)	
	10	5
pH	4.1 ± 0.2	4.3 ± 0.2
Concentración de H ₂ (%)	32.1 ± 6.9	14.5 ± 3.1
Productividad de H ₂ (NmL H ₂ /L _{lecho} *día)	316 ± 67	92.12 ± 20
(mmol H ₂ /gST)	1.4	0.8
Productos microbianos soluble (mg DQO/L)		
Ácido acético	720 ± 259	682 ± ---
Ácido propiónico	273 ± 4	106 ± ---
Ácido butírico	942 ± 194	1864 ± 1580
Ácido láctico	0.012 ± 0.07	ND
Acetona	ND	ND
Metanol	ND	ND
Etanol	ND	263 ± 79
Butanol	ND	76.7 ± ---
EtOH/PMS (%)	0 ± 0	15.7 ± 14.9
BuOH/PMS (%)	0 ± 0	6.1 ± ---
HAc/PMS (%)	36.6 ± 4.9	8.6 ± ---
HPr/PMS (%)	14.5 ± 3.6	1.3 ± ---
HBu/PMS (%)	48.8 ± 1.3	68.2 ± 9.4
A/B	0.8 ± 0.1	0.11 ± ---
AOVT (mg DQO/L)	1 935 ± 449	2258 ± 2139
PMS (mg DQO/L)	1 935 ± 449	2598 ± 1959
ρ, AOVT/SOLV	---	9.65 ± ---

Notas: A/B: relación ácido acético-ácido butírico. EtOH: etanol; BuOH: butanol; HAc: acetato; HPr: propionato; HBu: butirato; AOVT: ácidos orgánicos volátiles totales= HAc+HPr+HBu; PMS: productos microbianos solubles=AOVT+EtOH+BuOH. En bas: DQO/L. ND: no detectado

7.3 Actividad 3. Producción de H₂ en lote utilizando suero de leche como sustrato

7.3.1 Actividad 3.1. Estudios presuntivos de producción de H₂ en lote utilizando suero de leche como sustrato

7.3.1.1 Presuntivo 1

En la Figura 11 se muestra la producción de H₂ en los reactores en lote, como se puede observar existió un solo ciclo de producción en ambas temperaturas, la producción acumulada de H₂ obtenida a temperatura ambiente fue 1.14 veces mayor que a 35° C, pero debido a las desviaciones estándar altas no hay diferencia significativa (Tabla 25).

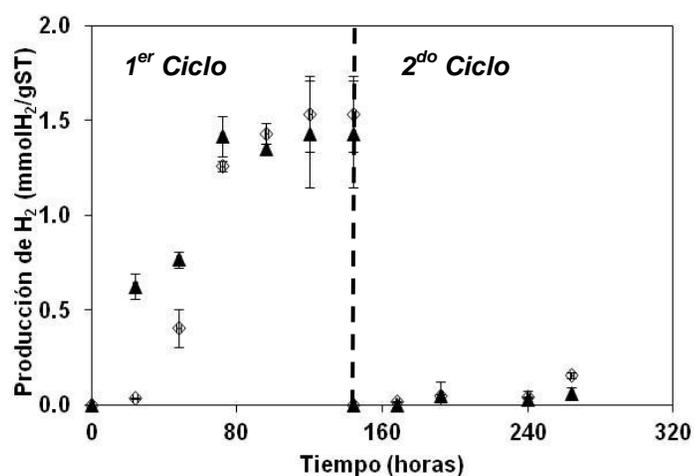


Figura 11. Producción de H₂ en reactores en lote utilizando suero de leche como sustrato. ◊ ambiente; ▲ 35°C. Línea punteada indica el momento del gaseado con N₂.

En cuanto a la $R_{i,H}$ la velocidad de producción de H₂ fue 1.21 veces mayor con incubación a 35° C que a temperatura ambiente. El tiempo de retardo con ambas temperaturas fue menor a 24 h. El pH final con ambas temperaturas fue de 4.5, este es un valor que se conoce se encuentra relacionado con la desviación de la fermentación hacia la solventogénesis, por lo que se decidió realizar un presuntivo para observar el efecto de la adición de una solución amortiguadora.

Tabla 25. Producción acumulada de H₂, velocidad inicial de producción y tiempo de retardo de la producción de H₂ experimento presuntivo 1.

Reactor	P _H (mmol H ₂ /g ST)			R _{i,H} (mmol H ₂ /(g ST x h))		T _{lag} (h)
	1 Ciclo	2 Ciclo	Total	1 Ciclo	2 Ciclo	1 Ciclo
A	1.54 ± 0.20	0.16 ± 0.02	1.70	0.014	---	< 24
M	1.43 ± 0.28	0.06 ± 0.03	1.49	0.017	---	< 24

Notas: A: ambiente ; M: 35°C; P_H: producción acumulada de H₂; R_{i,H}: velocidad inicial de producción de H₂; T_{lag}: tiempo de retardo de producción de H₂.

7.3.1.2 Presuntivo 2

Efecto de la adición de la solución amortiguadora

La adición de la solución amortiguadora tuvo un efecto positivo en la producción de H₂. Se obtuvo un segundo ciclo de producción a ambas temperaturas (Tabla 26). La producción en el segundo ciclo fue aproximadamente 60% de aquella obtenida solo en el primer ciclo. El tiempo de retardo de producción de H₂ fue menor a 24 horas en todos los casos.

En el primer ciclo, la producción acumulada de H₂ fue 1.3 veces mayor en los reactores con solución amortiguadora (SA) que aquellos sin ella (NSA). Esto pudo deberse a que existió en los SA un ΔpH (definido como pH inicial- pH final) menor (1.9) que el ΔpH obtenido para los NSA (2.8). Un alto ΔpH, implica un pH final menor y esto pudo afectar a los microorganismos productores de H₂ que quizá no se adaptaron al cambio rápido de pH (Khanal *et al.*, 2004).

Se realizó un tercer gaseado con N₂, pero no se observó producción de H₂, por lo que no existió un tercer ciclo de producción.

Tabla 26. Producción acumulada de H₂, velocidad inicial de producción y tiempo de retardo de la producción de H₂ experimento presuntivo 2.

Reactor	P _H (mmol H ₂ /gST)				R _{i,H} (mmol H ₂ /(gST h))			pH Inicial	pH Final	ΔpH
	1 Ciclo	2 Ciclo	Total	Valor de p	1 Ciclo	Valor de p	2 Ciclo			
A-NSA	1.37 ± 0.14	-----	1.37 ± 0.14	NA	0.031	NA	-----	7.39	4.70 ± 0.08	2.70 ± 0.08
A-SA	1.71 ± 0.02	1.35 ± 0.15	3.07 ± 0.13	NA	0.025	NA	0.028	5.9	4.02 ± 0.03	1.88 ± 0.03
M- NSA	1.36 ± 0.01	0.15 ± 0.13	1.51 ± 0.12	NA	0.040	NA	-----	7.39	4.47 ± 0.01	2.93 ± 0.01
M-SA	1.99 ± 0.03	0.96 ± 0.46	2.95 ± 0.13	NA	0.016	NA	0.02	5.9	3.99 ± 0.02	1.92 ± 0.02
SA*	1.85 ± 0.20	1.16 ± 0.28	3.01 ± 0.08		0.035		0.024	5.9	4.00 ± 0.03	1.90 ± 0.03
NSA**	1.37 ± 0.001	0.07 ± 0.10	1.44 ± 0.10	0.0008	0.021	< 0.0001	----	7.39	4.58 ± 0.14	2.81 ± 0.14
A***	1.54 ± 0.25	0.68 ± ---	2.22 ± 1.20		0.023	< 0.0001	0.014	6.65	4.36 ± 0.39	2.29 ± 0.47
M****	1.68 ± 0.45	0.55 ± ---	2.23 ± 1.02	0.9278	0.032		0.01	6.65	4.23 ± 0.28	2.42 ± 0.58

Notas: A-NSA: Temperatura ambiente sin adición de solución amortiguadora; M-NSA: 35°C sin adición de solución amortiguadora; A-SA: temperatura ambiente con solución amortiguadora; M-SA: 35°C con solución amortiguadora. P_H: producción acumulada de H₂; R_{i,H}: velocidad inicial de acumulación de H₂. *Promedios calculados mediante el uso de los resultados de A-SA y M-SA. ** Promedios calculados mediante el uso de los resultados de A-NSA and M-NSA. *** Promedios calculados mediante el uso de resultados de A-NSA and A-SA. **** Promedios calculados mediante el uso de resultados M-NSA y M-SA. Valor de p: es la probabilidad de obtener un valor de F de este tamaño si los términos no tuvieran efecto en la respuesta.

En todos los reactores (Tabla 27), el valor de A/B fue menor que el valor umbral de 0.79 determinado por (Robledo-Narváez et al., 2013), con lo que se puede decir que predominó la producción de H₂ via ácido bórico.

Tabla 27. Concentración de ácidos y solventes de la producción del presuntivo 2

Concentración (mg DQO/L)	A-NSA	A-SA	M-NSA	M-SA
Ácido acético	1 308 ± 207	1 675 ± 591	1 966 ± 232	1 462 ± 883
Ácido propiónico	523 ± 105	1 784 ± 845	400 ± 60	671 ± 43
Ácido bórico	4 362 ± 866	3 136 ± 125	4 378 ± 255	3 464 ± 304
Ácido láctico	ND	243.4 ± 43.5	ND	229.7 ± 4.28
Acetona	ND	ND	ND	ND
Metanol	ND	ND	ND	ND
Etanol	303 ± 161	55.1 ± 14.7	128.2 ± 26.1	173.0 ± 26.0
Butanol	1 422 ± 186	56.5 ± 41.8	216.5 ± 47.1	86.7 ± 38.1
EtOH/PMS (%)	2.4 ± 2.1	0.8 ± 0.2	1.8 ± 0.3	2.9 ± 0.7
BuOH/ PMS (%)	9.6 ± 9.6	1.2 ± 1.1	3.0 ± 0.5	1.5 ± 0.8
HAc/ PMS (%)	22.3 ± 9.2	28.8 ± 1.6	26.9 ± 2.9	30.2 ± 1.2
HPr/ PMS (%)	16.8 ± 15.8	27.5 ± 15	5.1 ± 0.7	10.5 ± 1.7
HBu/ PMS (%)	51.7 ± 4.0	48.8 ± 5.0	61.2 ± 3.7	56.5 ± 8.3
A/B	0.28 ± 0.04	0.54 ± 0.18	0.45 ± 0.1	0.6 ± 0.3
AOVT	6 193 ± 345	5 702 ± 1 281	6 743 ± 259	6 102 ± 600
PMS	7 919 ± 214	5 776 ± 1 270	7 088 ± 326	7 241 ± 427
ρ	3.6 ± 0.5	79.2 ± 27.1	19.9 ± 2.9	23.6 ± 7.3

Notas: A/B: relación ácido acético-ácido bórico. EtOH: etanol; BuOH: butanol; HAc: acetato; HPr: propionato; HBu: bórico; AOVT: ácidos orgánicos volátiles totales= HAc+HPr+HBu; PMS: productos microbianos solubles=AOVT+EtOH+BuOH. En bas: DQO/L. ND: no detectado

Se observó diferencia significativa en la producción de ácido bórico (HBu) en los reactores con solución amortiguadora y sin solución amortiguadora. Es importante mencionar que la producción de HBu en los reactores sin solución amortiguadora fue 1.3 veces mayor que en los reactores con la solución, a pesar de que solo se tuvo un ciclo de producción de H₂.

Algunos estudios han observado altas concentraciones de ácido butírico con una baja producción de H_2 (Van Ginkel & Logan, 2005) ya que el HBU no disociado se ha relacionado con la iniciación de la solventogénesis (Husemann & Papoutsakis, 1987).

En este trabajo, la relación ρ ratios en los reactores sin solución amortiguadora fue menor que en los reactores con ella, lo que indica una producción de solventes mayor. Van den Heuvel *et al.* (1992) determinaron que la concentración inhibitoria crítica de HBU no disociado para el cambio a solventogénesis fue 50 mM; en nuestro trabajo, los reactores sin solución amortiguadora mostraron una concentración de HBU al final del primer ciclo cercana al valor crítico (41.02 ± 0.5 mM), mientras los reactores con solución produjeron 31.2 ± 2.6 mM después del segundo ciclo.

Efecto de la temperatura

No se observó diferencia significativa en la producción acumulada de H_2 , la concentración de ácidos orgánicos y la relación ρ a ambas temperaturas. Algunos autores reportan una mayor producción de H_2 a temperaturas altas (Akutsu *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008; Youn & Shin, 2005). Sin embargo, en nuestro trabajo se obtuvo un buen desempeño a temperatura ambiente.

La producción favorable obtenida a bajas temperaturas se encuentra en concordancia con lo obtenido por Infantes *et al.* (2011), ellos investigaron la influencia del pH y la temperatura en una fermentación en lote, usando glucosa como sustrato. Estos autores sugieren que el efecto del bajo pH a altas temperaturas puede ocasionar una inhibición mayor debido a la alta concentración de ácidos orgánicos no disociados. El incremento en la temperatura puede inducir dos efectos: (i) se eleva el metabolismo microbiano y (ii) se incrementa la permeabilidad de la membrana (Bischof *et al.*, 1995; Zoetemeyer *et al.*, 1982).

7.3.2 Actividad 3.2. Producción de H₂ en lote utilizando suero de leche como sustrato

7.3.2.1 Efecto de la temperatura: 35° C vs temperatura ambiente

Se observaron dos ciclos de producción de H₂ a temperatura ambiente, mientras que solo uno a 35° C (Tabla 28). Los 23 experimentos fueron sujetos a un ANOVA con el programa Design Expert 6.0 (Design-Ease, Inc., Minneapolis). Se puede observar en la Tabla 29 que la temperatura, la concentración de sustrato y el pH son factores que mostraron un efecto significativo sobre la producción acumulada de H₂. De forma particular, la producción acumulada de H₂ a temperatura ambiente fue casi dos veces la obtenida a 35° C ($p < 0.05$).

Es importante mencionar que la mayoría de los resultados de la relación ρ son más altos a temperatura ambiente que a 35° C, esto indica que existe menor cantidad de solventes a temperatura ambiente que a 35° C, y como se ha mencionado anteriormente, la producción de solventes está relacionada con una baja producción de H₂.

Tabla 28. Producción acumulada de H₂, relación ρ y relación A/B a 35° C y temperatura ambiente

	Condición (g DQO/L)/ pH	35° C			Temperatura ambiente			
		P _{H2} (mmol H ₂ /gST)	ρ	A/B	P _{H2} (mmol H ₂ /gST)		ρ	A/B
					1 ciclo	2 ciclo		
1	35 / 6.2	1.14 ± 0.58	7.53 ± 3.32	0.56 ± 0.09	2.87 ± 0.20	0.07 ± 0.03	15.33 ± 14.98	0.027 ± 0.004
2	35 / 4.8	0.10 ± 0.01	12.21 ± 2.49	1.26 ± 0.60	0.59 ± 0.13	0.11 ± 0.08	6.03 ± 1.83	0.28 ± 0.21
3	10 / 6.2	3.53 ± 0.48	57.82 ± 6.07	0.44 ± 0.07	8.35 ± 1.24	0.02 ± 0.02	12.41 ± 8.24	0.02 ± 0.01
4	10 / 4.8	0.59 ± 0.16	2.00 ± 0.91	5.40 ± 1.66	1.30 ± 0.24	0.63 ± 0.37	3.12 ± 1.95	0.39 ± 0.33
5-9	22.5 / 5.5	1.42 ± 0.10	4.04 ± 0.99	0.29 ± 0.17	2.61 ± 0.26	0.29 ± 0.08	11.79 ± 6.38	0.10 ± 0.10
10	40.2 / 5.5	0.42 ± 0.06	13.83 ± 1.92	0.11 ± 0.02	1.79 ± 0.15	0.09 ± 0.09	10.53 ± 4.27	0.19 ± 0.19
11	4.8 / 5.5	4.05 ± 1.89	1.04 ± 0.09	2.23 ± 0.18	6.51 ± 0.48	0.53 ± 0.16	23.26 ± 23.26	0.24 ± 0.12
12	22.5 / 6.5	2.70 ± 0.51	7.91 ± 1.37	0.48 ± 0.02	4.90 ± 0.45	0.67 ± 0.67	10.84 ± 10.84	0.35 ± 0.04
13	22.5 / 4.5	0.00 ± 0.00	4.01 ± 0.10	2.01 ± 0.95	0.14 ± 0.05	0.01 ± 0.01	8.90 ± 1.32	5.88 ± 5.88

Notas: ^a producción acumulada de H₂ (mmolH₂/g_{ST}); ^b Relación entre la suma de ácidos orgánicos y la suma de solventes (adimensional); ^c relación entre la producción de ácido acético y la producción de ácido butírico (adimensional).

Tabla 29. Análisis de varianza del experimento 2³, factores: temperatura, concentración de sustrato y pH inicial

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value	Prob >F
Modelo	96.55	3	32.18	51.75	0.0012 <i>Significativo</i>
Temperatura	29.99	1	29.99	48.23	0.0023 <i>Significativo</i>
Concentración de sustrato	28.84	1	28.84	46.38	0.0024 <i>Significativo</i>
pH	37.71	1	37.71	60.64	0.0015 <i>Significativo</i>

7.3.2.2 Superficie de respuesta: 35° C vs temperatura ambiente

Se realizó un ANOVA con el programa Design Expert 6.0 para los 23 experimentos a cada temperatura (Tabla 30). La concentración de sustrato y el pH mostraron tener efecto significativo sobre la producción acumulada de H₂ a ambas temperaturas, mientras que la interacción entre factores fue significativa solo a temperatura ambiente.

La ecuación final que representa las superficies de respuesta en términos de factores actuales se muestra en la Tabla 31. En las Figuras 12 y 13 se pueden observar las superficies de respuesta de la acumulación de H₂. A una concentración baja de concentración de sustrato y un pH alto se observaron mayores producciones de acumuladas de H₂ comparadas con lo obtenido a alta concentración de sustrato y bajo pH. Este mismo patrón se observó a ambas temperaturas.

Tabla 30. Probabilidades significativas de ANOVAs de las variables de respuesta para las superficies de respuesta

Temperatura	Source	Variables de respuesta		
		$P_{H_2}^a$	ρ^b	A/B ^c
35° C	Concentración de sustrato	< 0.0001 <i>Significativo</i>	< 0.0001 <i>Significativo</i>	0.0005 <i>Significativo</i>
	pH	< 0.0001 <i>Significativo</i>	0.3705 <i>no significativo</i>	0.0002 <i>Significativo</i>
	Interacción	0.0584 <i>no significativo</i>	0.0027 <i>Significativo</i>	0.0018 <i>Significativo</i>
	Concentración de sustrato ²	0.1681 <i>no significativo</i>	0.1977 <i>no significativo</i>	0.0244 <i>Significativo</i>
	pH ²	0.4899 <i>no significativo</i>	0.2688 <i>no significativo</i>	0.0184 <i>Significativo</i>
	Modelo	< 0.0001 <i>Significativo</i>	0.0120 <i>Significativo</i>	< 0.0001 <i>Significativo</i>
Ambiente	Concentración de sustrato	< 0.0001 <i>Significativo</i>	0.5651 <i>no significativo</i>	0.9579 <i>no significativo</i>
	pH	< 0.0001 <i>Significativo</i>	0.3163 <i>no significativo</i>	0.0281 <i>Significativo</i>
	Interacción	< 0.0001 <i>Significativo</i>	0.9998 <i>no significativo</i>	0.9638 <i>no significativo</i>
	Concentración de sustrato ²	0.0006 <i>Significativo</i>	0.6817 <i>no significativo</i>	0.6217 <i>no significativo</i>
	pH ²	0.5618 <i>no significativo</i>	0.5880 <i>no significativo</i>	0.0836 <i>no significativo</i>
	Modelo	< 0.0001 <i>Significativo</i>	0.8012 <i>no significativo</i>	0.0830 <i>no significativo</i>

Notas: ^a producción acumulada de H₂ (mmolH₂/gST); ^b Relación entre la suma de ácidos orgánicos y la suma de solventes (adimensional); ^c relación entre la producción de ácido acético y la producción de ácido butírico (adimensional).

Tabla 31. Ecuaciones finales en términos de factores actuales

Temperatura	Source	Variables de respuesta		
		$P_{H_2}^a$	ρ^b	A/B ^c
35° C	Independiente	- 19.19822	+ 18.39506	+ 66.98548
	Concentración de sustrato	+ 0.13410	+ 7.84729	- 0.91706
	Ph	+ 5.88292	+ 46.53696	- 18.81638
	Interacción	- 0.054571	- 1.72829	+ 0.12157
	Concentración de sustrato ²	+ 1.9024 E-003	+ 0.031965	+ 3.96200 E-003
	pH ²	- 0.29643	+ 8.68533	+ 1.33482
Ambiente	Independiente	- 32.06408	- 124.89706	+ 77.90228
	Concentración de sustrato ²	+ 0.42095	- 0.55726	-0.070154
	pH	+ 8.50074	+ 48.67000	-27. 06518
	Interacción	- 0.13800	+ 9.52381E-005	+ 3.33333E-003
	Concentración de sustrato ²	+ 4.568 E-003	+ 9.66 E-003	- 2. 00907 E-003
	pH ²	-0.21497	- 4.07283.	+ 2.31684

Notas: ^a producción acumulada de H₂ (mmolH₂/gST); ^b Relación entre la suma de ácidos orgánicos y la suma de solventes (adimensional); ^c relación entre la producción de ácido acético y la producción de ácido butírico (adimensional).

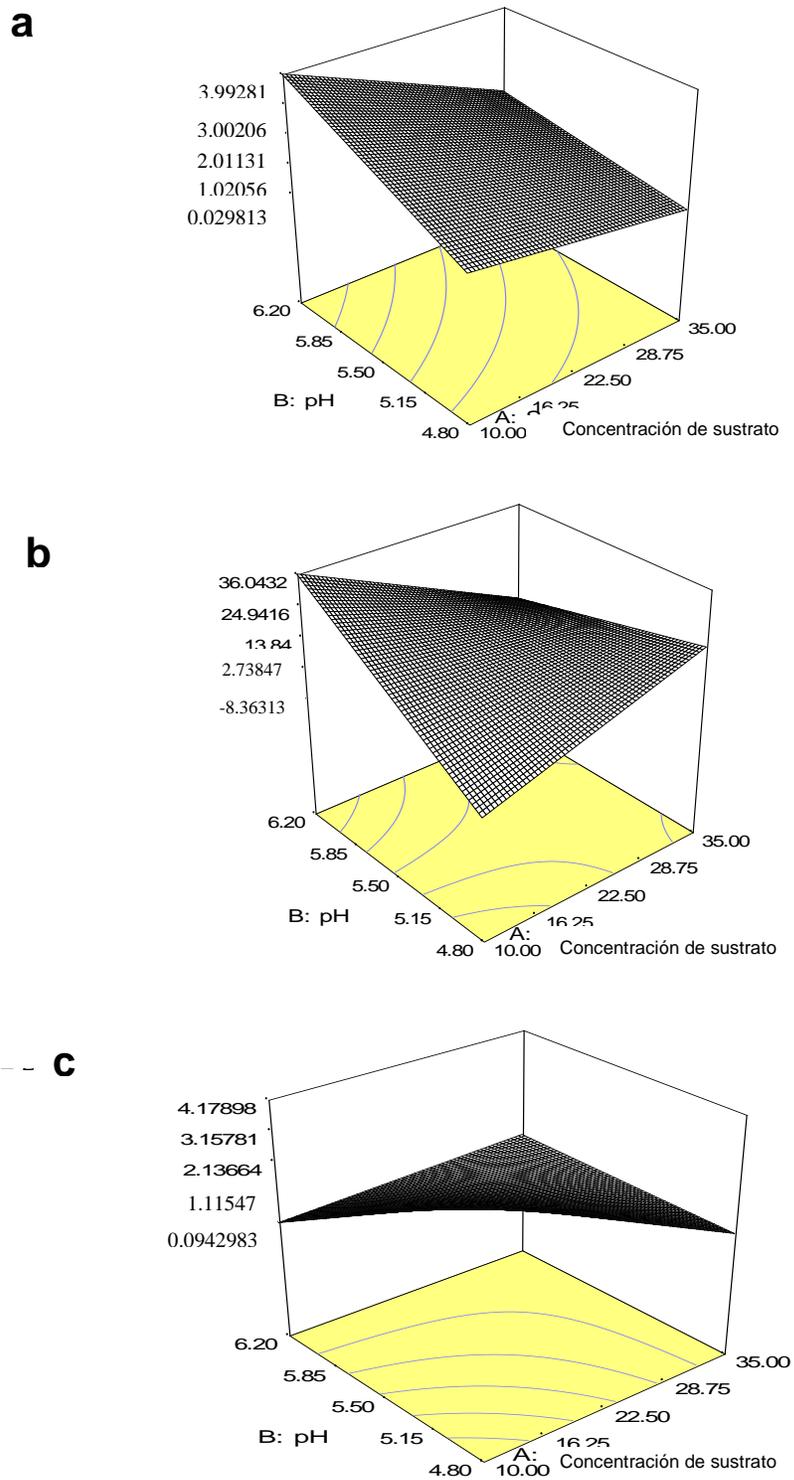


Figura 12. Superficie de respuesta a 35° C: (a) producción acumulada de H₂, (b) relación ρ , (c) relación A/B.

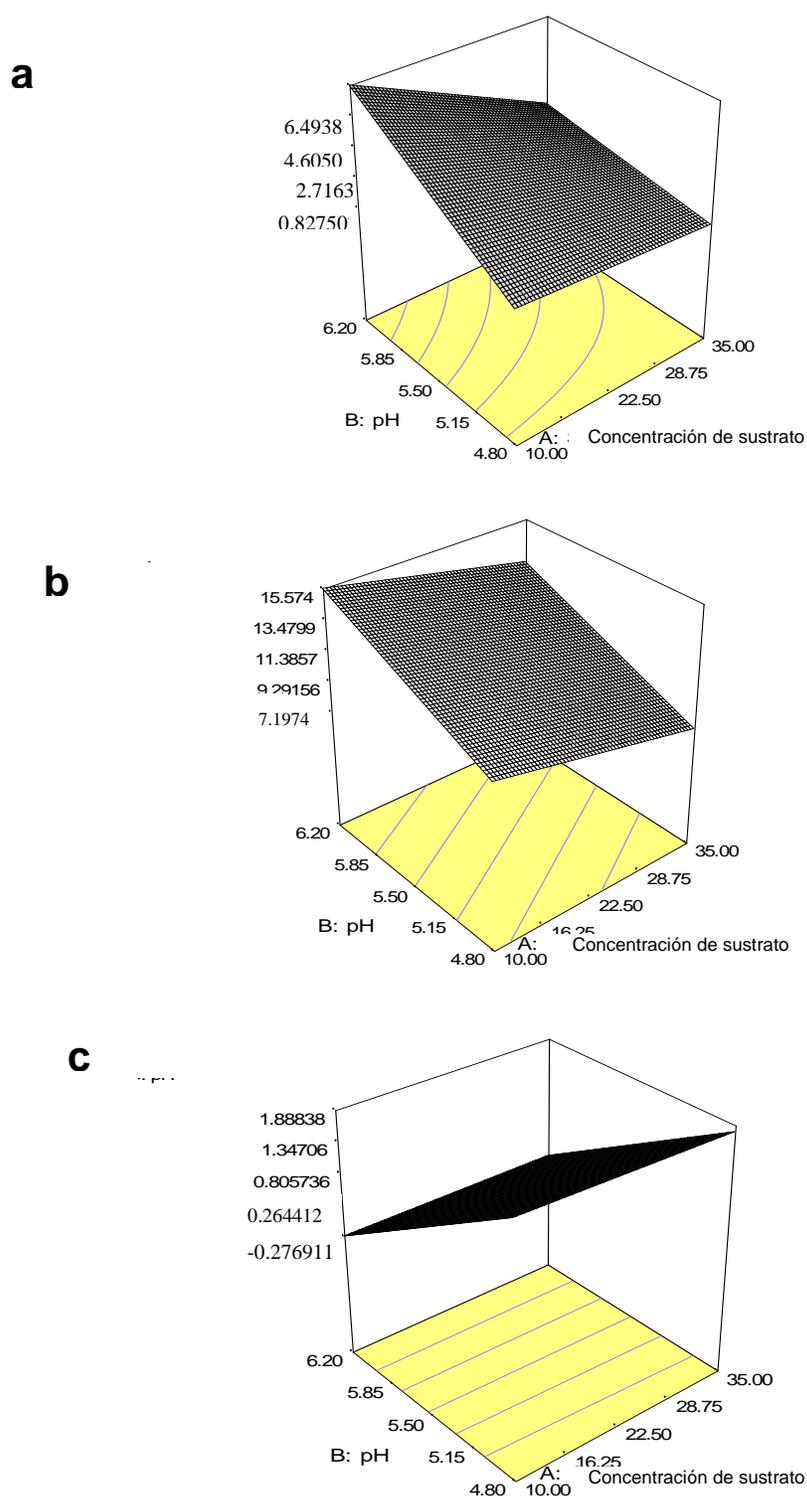


Figura 13. Superficie de respuesta a temperatura ambiente: (a) producción acumulada de H_2 , (b) relación ρ , (c) relación A/B.

7.4 Comparación con otras investigaciones de producción de H₂ utilizando suero de leche como sustrato

En la Tabla 32 se muestra la producción de H₂ utilizando suero de leche como sustrato, principalmente en sistemas en continuo, se puede ver que los resultados obtenidos en esta investigación en continuo se encuentran en el punto intermedio, mientras que en los resultados en lote nos encontramos en el punto alto.

Es importante remarcar que los resultados obtenidos en nuestros trabajos han sido a temperaturas menores que las otras investigaciones y sin realizarle tratamiento térmico al sustrato, situaciones que ahorrarían energía.

Tabla 32. Producción de H₂ utilizando suero de leche como sustrato.

Inóculo	Condiciones de fermentación	Sustrato/ Carga volumétrica (gDQO/(L*día) ⁻¹)	Pseudo rendimiento Y' (mmolH ₂ /gST)	Productos microbianos solubles	Ref
Lodo con tratamiento térmico (tt; 85° C/45 min)	TRH ^a : 1, 2 y 3.5 d T: 55°C; pH 5.5 Continuo	SL fresco con tratamiento térmico (105°C/ 5min) 47	0.91	Acetato, butirato, propionato, isobutirato, isocapronato, formato, lactate	1
Reactor acidogénico	TRH=12 h T:30°C; pH=5 Continuo	SL almacenado a 4°C 20	0.18	Acetato, butirato, lactato y valerato	2
Digeridos de un CSTR ^b	TRH = 24 h T:35°C; pH: 5.2 Continuo	SL almacenado a -20°C 30	1.5	Acetato, butirato, lactato	3
Microflora anaerobia mixta de un UASB ^c con tt	TRH = 24 h T:55°C; pH=5.5 Continuo	SL con tratamiento térmico (85°C / 30 min) 30	3.5	Lactato, butirato	4
Sludge from a UASB reactor	RLF TRH:4 h T=30°C Continuo	Polvo 5	3.12	Etanol, metanol, ácido butírico, ácido acético	5
Digeridos de un reactor anaerobio con tt (90°C, 1 h)	TRH =24 h T:25°C pH=4.1 Continuo	Polvo 10.04	1.4	Acetato, propionato, butirato, etanol, butanol, lactate	6
Biopartículas de un RLF ^d	T: 25°C; 35°C pH: 5.9 Lote	Polvo 10.04* Con solución amortiguadora de fosfatos	2.89 ambiente 2.79 35°C	Acetato, propionato, butirato, etanol, butanol, lactate	7

Notas: ^a Tiempo de retención hidráulico; ^b reactor de mezcla completa; ^c reactor anaerobio de flujo ascendente; ^d reactor de lecho fluidizado. Referencias. 1. Azbar *et al.*, 2009; 2. Castelló *et al.*, 2009; 3. Venetsaneas *et al.*, 2009; 4. Azbar & Dokgoz, 2010; 5. Ferreira Rosa *et al.*, 2014; 6 y 7 Esta investigación * concentración de sustrato (g DQO/L)

7.5 Actividad 4. Estudio de la comunidad microbiana en los experimentos de fermentación oscura

7.5.1.1 DGGE

El estudio de la comunidad microbiana se realizó en las biopartículas del reactor de lecho fluidizado a temperatura ambiente. El gel de DGGE obtenido se muestra en la Figura 14. En un rectángulo blanco se muestra la banda que pudo ser identificada, se seleccionó esta banda ya que se observó que se incrementó su intensidad a partir del uso de SL y de los tratamientos térmicos.

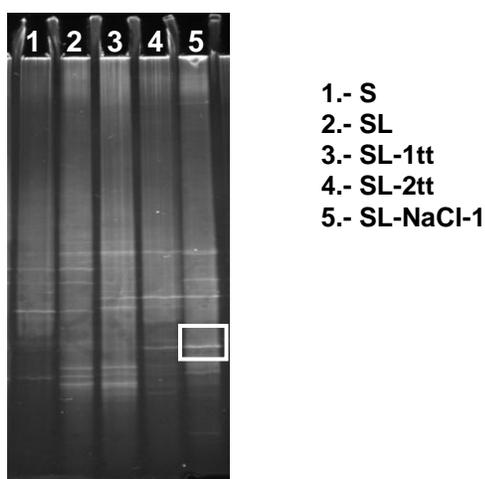


Figura 14. Gel de DGGE de las diferentes etapas de operación del RLF-A. S: 10 g/L_{lecho}*día de sacarosa; SL: 10 g/L_{lecho}*día suero de leche; SL-1tt: 10 g/L_{lecho}*día de suero de leche y primer tratamiento térmico; SL-2tt: 10 g/L_{lecho}*día suero de leche y el segundo tratamiento térmico; y SL-NaCl-2: 10 g/L_{lecho}*día de SL y NaCl.

El gel preparativo de la banda seleccionada, se muestra en la Figura 15.



Carril	Etapas
1-4	Vacío
5	Suero de leche 10 g/L _{lecho} *día (NaCl)
6	Vacío
7-10	Suero de leche 10 g/L _{lecho} *día (NaCl)
11	Vacío
12	<i>E. coli</i> SK 10019
13-16	Vacío

Figura 15. Gel de DGGE preparativo de la muestra del reactor de lecho fluidizado operado a temperatura ambiente alimentado con suero de leche (10 g/L_{lecho}*día) con NaCl.

La banda fue clonada con el vector pJET 1.2 (descrito en la metodología) y posteriormente secuenciada. El microorganismo con el que se tuvo mayor similitud fue con *Propionibacterium cyclohexanicum* sp. nov. Este es un microorganismo aislado de jugo de naranja que crece a pH de 3.2-7.5 y si recordamos, el pH promedio de la operación del RLF-A fue de 4.1 ± 0.2 que entra en el rango del crecimiento descrito para este microorganismo. El microorganismo genera ácido láctico, propiónico y acético a partir de glucosa (Kusano *et al.*, 1997).

Se calculó el índice de Jaccard para cada etapa de producción (Tabla 33), si el índice es cercano a 0 el perfil de riqueza son completamente distintos, pero si es cercano a 1 entonces son muy similares. Con esto se puede observar que el perfil de la operación con sacarosa es moderadamente diferente al perfil obtenido con suero de leche (IJ=0.4). Esto puede deberse tanto al cambio por un sustrato más complejo como a que la concentración real del carbohidrato en el suero de leche es menor (7 g lactosa/L) mientras que con sacarosa es de 10 g /L.

Tabla 33. Índices de similaridad de Jaccard, índice de divergencia de Poggi, y coeficiente dinámico de divergencia

Línea	Etapa	Índice de similaridad de Jaccard (IJ)					Índice de divergencia de Poggi (Δ_P)					Coeficiente dinámico de divergencia ($\dot{\Delta}_P$)				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	S	1	0.4	0.2	0.1	0.1	1	0.39	0.58	0.55	0.57	NA	0.020	0.006	0.005	0.003
2	SL		1	0.5	0.2	0.2		1	0.28	0.48	0.35		NA	0.018	0.009	0.006
3	SL-1tt			1	0.2	0.2			1	0.46	0.41			NA	0.027	0.009
4	SL-2tt				1	0.4				1	0.21				NA	0.018
5	SL-NaCl-1					1					1					NA

Notas: S: 10 g/L_{lecho}*día de sacarosa; SL: 10 g/L_{lecho}*día suero de leche; SL-1tt: 10 g/L_{lecho}*día de suero de leche y primer tratamiento térmico; SL-2tt: 10 g/L_{lecho}*día suero de leche y el segundo tratamiento térmico; y SL-NaCl-2: 10 g/L_{lecho}*día de SL y NaCl.

El perfil con sacarosa es muy diferente (IJ=0.1; Tabla 33) al perfil de suero de leche con NaCl. Es importante resaltar, que antes de llegar a la etapa cuatro se le dieron dos tratamientos térmicos al lecho. Huang *et al.*, 2010 observaron que el tratamiento térmico podría resultar en la eliminación de bacterias no productoras de esporas con la consecuente reducción en la conversión del sustrato a H₂. En cuanto al coeficiente de

divergencia de Poggi, los valores obtenidos son bajos y pueden ser relacionados con reactores de crecimiento en lecho.

7.5.1.2 Secuenciamiento masivo de genoteca de 16S rDNA

En la Figura 16 se muestran los phyla de las secuencias detectadas con el secuenciamiento masivo. Los principales phyla observados fueron: *Firmicute*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, y *Actinobacteria*. En la etapa con sacarosa, la abundancia relativa fue: 70% *Firmicutes*, 6%, *Proteobacteria*, 21% *Bacteroidetes* y 3% *Actinobacteria*. Con el cambio de sustrato, *Firmicutes* (91%) y *Actinobacteria* (5%) se incrementaron, mientras que existió una disminución sustancial de *Proteobacteria* (2%) y *Bacteroidetes* (2%). Es importante recordar que la productividad de H₂ disminuyó con el cambio a suero de leche. La tendencia en las abundancias relativas continuó después del primer tratamiento térmico en donde no se detectó producción H₂.

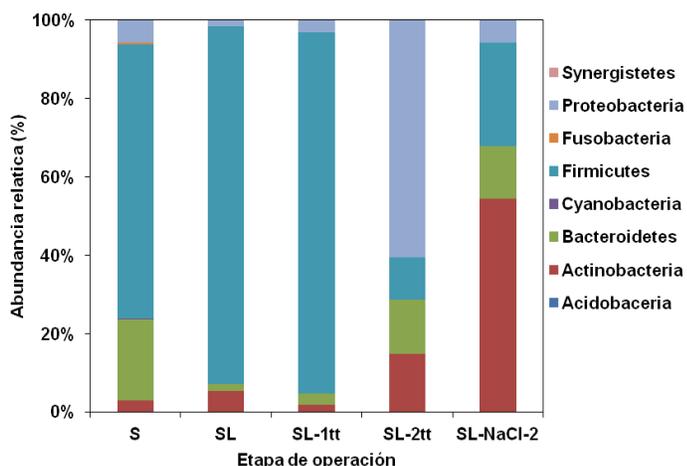


Figura 16. Abundancia relativa de los phyla de cada etapa de producción de H₂. S: 10 g/L_{lecho}*día de sacarosa; SL: 10 g/L_{lecho}*día suero de leche; SL-1tt: 10 g/L_{lecho}*día de suero de leche y primer tratamiento térmico; SL-2tt: 10 g/L_{lecho}*día suero de leche y el segundo tratamiento térmico; y SL-NaCl-2: 10 g/L_{lecho}*día de SL y NaCl.

Con el segundo tratamiento térmico, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria* incrementaron su abundancia hasta 14%, 61% y 15%, respectivamente; mientras que *Firmicutes* disminuyó a 11%. En este periodo tampoco se observó producción de H₂.

Durante la operación con suero de leche y NaCl (5 g/L.día) *Firmicutes* y *Actinobacteria* se incrementaron a 26 y 54%, respectivamente; *Proteobacteria* se redujo a 6% y *Bacteroidetes* se mantuvo en 3%. En este periodo la productividad de H₂

se incrementó dos veces con respecto a lo detectado con suero de leche solo. Parece que el incremento en la abundancia relativa de *Actinobacteria* se relacionó con un mejor desempeño del RLF-A.

Las curvas de rarefacción han sido utilizadas para evaluar si el tamaño de la genoteca es adecuada. Las curvas de rarefacción obtenidas se muestran en la figura Figura 17, se puede observar que ninguna de las curvas alcanzan un punto asintótico, esto puede indicar que no se han estimado el número total de especies o riqueza (Cordes *et al.*, 2010).

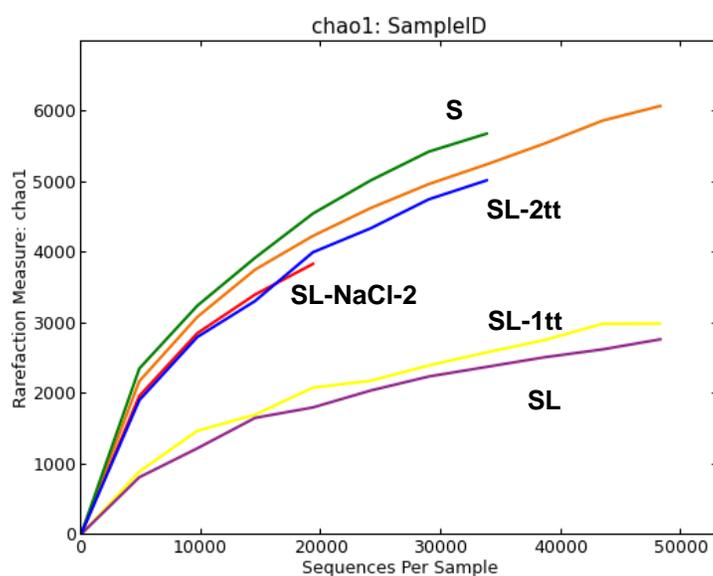


Figura 17. Curvas de rarefacción. S: 10 g/L_{lecho}*día de sacarosa; SL: 10 g/L_{lecho}*día suero de leche; SL-1tt: 10 g/L_{lecho}*día de suero de leche y primer tratamiento térmico; SL-2tt: 10 g/L_{lecho}*día suero de leche y el segundo tratamiento térmico; y SL-NaCl-2: 10 g/L_{lecho}*día de SL y NaCl.

En la Tabla 34 se muestran los microorganismos detectados hasta género, es importante mencionar que se tomaron en cuenta los microorganismos que al menos tenían una abundancia relativa > 1% en alguna de las etapas de producción.

Tabla 34. Perfil de microorganismos detectados en el secuenciamiento masivo en las distintas etapas de operación del RLF-A

Filo	Clase	Orden	Género	Abundancia relativa (%)				
				S	SL	SL-1tt	SL-2tt	SL-NaCl-2
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Lentzea</i>	0.0	0.0	0.0	5.0	0.2
			<i>Rhodococcus</i>	0.0	0.0	0.0	2.6	0.3
			<i>Propionibacteriaceae (family)*</i>	1.3	0.4	0.1	2.0	5.5
			<i>Streptomyces</i>	0.1	0.0	0.0	1.0	1.2
		<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacterium</i>	0.5	0.0	0.7	2.0	44.3
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroides</i>	6.9	0.1	0.1	0.7	1.0
			<i>Prevotella</i>	11.1	1.6	2.8	7.0	11.4
	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacterium</i>	0.0	0.0	0.0	4.8	0.1
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Sporolactobacillus</i>	19.9	1.4	0.2	0.0	0.2
		<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillus</i>	1.0	6.0	65	0.0	0.0
			<i>Lactococcus</i>	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0
	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiales (order)*</i>	2.8	0.3	0.3	0.7	1.1
			<i>Clostridiaceae (family)*</i>	1.7	10.1	2.6	1.6	0.6
			<i>Clostridium</i>	11.6	20.9	11.2	0.6	7.7
			<i>Lachnospiraceae (family)*</i>	7.2	0.5	0.7	2.1	3.6
			<i>Coproccoccus</i>	1.6	0.1	0.1	0.5	0.6
			<i>Lachnospira</i>	1.0	0.1	0.1	0.4	0.6
			<i>Ruminococcaceae (family)*</i>	3.5	9.3	0.7	1.1	1.8
			<i>Anaerofilum</i>	0.1	2.2	0.0	0.0	0.0
			<i>Ethanoligenens</i>	1.2	30.4	3.9	0.0	0.3
			<i>Faecalibacterium</i>	7.0	0.4	0.6	1.9	3.7
			<i>Oscillospira</i>	1.5	0.6	0.1	0.4	1.1
<i>Ruminococcus</i>	1.6	7.3	4.5	1.2	1.2			
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Rhizobiales (order)*</i>	0.0	0.0	0.0	1.1	0
			<i>Xanthobacter</i>	0.0	0.0	0.0	5.0	0.1
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Curvibacter</i>	0.0	0.0	0.0	18.8	0.1
			<i>Oxalobacteraceae (family)*</i>	0.1	0.0	0.0	18.0	0.2
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Aeromonadales</i>	<i>Succinivibrio</i>	1.3	2.1	1.2	0.4	0.6
		<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae (family)*</i>	2.4	0.7	1.6	1.2	0.6
		<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonas</i>	0.1	0.0	0.1	1.3	0.1
		<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae (family)*</i>	0.0	0.0	0.0	0.1	1.2

Notas: *no se identificó hasta género. S: 10 g/L_{lecho}*día de sacarosa; SL: 10 g/L_{lecho}*día suero de leche; SL-1tt: 10 g/L_{lecho}*día de suero de leche y primer tratamiento térmico; SL-2tt: 10 g/L_{lecho}*día suero de leche y el segundo tratamiento térmico; y SL-NaCl-2: 10 g/L_{lecho}*día de SL y NaCl.

El género *Clostridium* es uno de los conocidos como productores de H₂ (Chen *et al.*, 2005), su abundancia relativa se incrementó casi dos veces cuando se realizó el cambio de sustrato, pero inesperadamente, menos H₂ fue producido. Esto pudo deberse a que se presentaron menos bacterias que a pesar de no ser *Clostridia* si contribuían con la degradación del sustrato (Lo *et al.*, 2008). Además, no todas las especies de *Clostridia* son productoras de H₂ (Hung *et al.*, 2011).

Se detectó la presencia de *Lactobacillus* (Tabla 34) que como se mencionó anteriormente, son microorganismos que se encuentran relacionados con la baja producción de H₂ (Saraphirom & Reungsang, 2011). En la etapa de alimentación con sacarosa se observó un porcentaje de *Lactobacillus* (1%) que se incrementó con el cambio a suero de leche (6%), en donde disminuyó la productividad de H₂ 10 veces.

Después del primer tratamiento térmico, el sustrato fue suero de leche y como se puede ver la abundancia relativa de *Lactobacillus* se incrementó hasta 66%. Después del segundo tratamiento térmico se alimentó al inicio con sacarosa y después con suero de leche, la abundancia relativa de *Lactobacillus* disminuyó hasta 0.1% pero no se detectó H₂. Quizá se debió a que la abundancia relativa de *Clostridium* disminuyó hasta 0.6%.

Interesantemente, en la etapa de suero de leche y NaCl el porcentaje de *Bifidobacterium* fue casi diez veces mayor que en la etapa con solo suero de leche. Los *Bifidobacterium sp.* son microorganismos que se han encontrado en fermentaciones de H₂ en donde el sustrato ha sido xilosa y almidón, y se ha observado que puede contribuir a la ruptura del sustrato (Huang *et al.*, 2010; Saraphirom & Reungsang, 2011). Durante la producción de H₂ utilizando almidón, Cheng *et al.*, 2008, observaron que cuando se detectó el mayor rendimiento de producción de H₂ los principales microorganismos detectados fueron *Clostridium sp.* y *Bifidobacterium sp.*

Los índices de Shannon-Weaver de cada etapa de operación se muestra en la Tabla 35. EL índice disminuye casi 2 veces de la etapa con sacarosa a la etapa con suero de leche, esto pudo deberse a que se realizó el cambio a un sustrato más complejo. Se observó un incremento en el índice de Shannon-Weaver con el segundo tratamiento térmico, quizá debido a que en esta etapa se alimentó unos días con sacarosa antes

que con suero de leche y esto pudo permitir el crecimiento de distintos microorganismos.

En la Tabla 35 se muestran los valores de Ω . Es importante mencionar que si Ω es bajo, la comunidad no es tan diversa como parecía. Si Ω es alta, las secuencias son genéticamente más distantes. En nuestro trabajo, el Ω disminuyó con el cambio de sustrato de sacarosa a suero de leche, lo que indica una menor diversidad intrínseca. Esto pudo deberse al cambio a un sustrato más complejo.

Tabla 35. Índice de Shannon-Weaver en las distintas etapas de operación

Etapa	Filo (H'Ph)			Género (H'g)			Ω_2
	H'Ph ₁₀	H'Ph ₂	H'Ph _e	H'g ₁₀	H'g ₂	H'g _e	
S	0.38	1.27	0.88	1.00	3.34	2.31	2.06
SL	0.16	0.54	0.38	0.85	2.84	1.97	1.24
SL-1tt	0.15	0.51	0.35	0.57	1.89	1.31	0.98
SL-2tt	0.48	1.61	1.11	0.97	3.22	2.24	2.28
SL-NaCl-2	0.49	1.62	1.12	0.77	2.57	1.84	2.04

Notas: S: 10 g/L_{lecho}*día de sacarosa; SL: 10 g/L_{lecho}*día suero de leche; SL-1tt: 10 g/L_{lecho}*día de suero de leche y primer tratamiento térmico; SL-2tt: 10 g/L_{lecho}*día suero de leche y el segundo tratamiento térmico; y SL-NaCl-2: 10 g/L_{lecho}*día de SL y NaCl.

De igual forma se estimó el índice de Pielou (por género; Tabla 36) de las diferentes etapas de operación del RLF- A. Se observó que en la operación con suero de leche y con suero de leche y en el primer tratamiento térmico se obtuvo la mínima uniformidad de géneros, mientras que en la operación con sacarosa, con suero de leche y el segundo tratamiento térmico y con suero de leche y NaCl se presentó una uniformidad intermedia.

Tabla 36. Índice de Pielou en las distintas etapas de operación del RLF-A

Stage	Filo (J'Ph)			Género (H'g)		
	J'Ph ₁₀	J'Ph ₂	H'Ph _e	J'g ₁₀	J'g ₂	J'g _e
S	0.42	0.42	0.42	0.67	0.67	0.67
SL	0.18	0.18	0.18	0.57	0.57	0.57
SL-1tt	0.17	0.17	0.17	0.38	0.38	0.38
SL-2tt	0.54	0.54	0.54	0.65	0.65	0.65
SL-NaCl-2	0.54	0.54	0.54	0.52	0.52	0.53

Notas: S: 10 g/L_{lecho}*día de sacarosa; SL: 10 g/L_{lecho}*día suero de leche; SL-1tt: 10 g/L_{lecho}*día de suero de leche y primer tratamiento térmico; SL-2tt: 10 g/L_{lecho}*día suero de leche y el segundo tratamiento térmico; y SL-NaCl-2: 10 g/L_{lecho}*día de SL y NaCl.

7.6 Actividad 5. Estudios del potencial hidrogenogénico fotoheterotrófico de los licores fermentados (para detectar inhibición de N-3)

Se le llama licor fermentado (LF) al efluente del reactor de lecho fluidizado a temperatura ambiente que usó como sustrato suero de leche. El LF que se usó para la fermentación fotoheterótrofa fue de la etapa en dónde se utilizó suero de leche sin adición de NaCl. Como control se utilizó el medio Pfenning ya que este es uno de los medios más usados para la producción de H₂.

Se observó mayor producción de H₂ con *Rhodopseudomonas palustris* (Rp) que con el cultivo mixto (M; Figura 18).

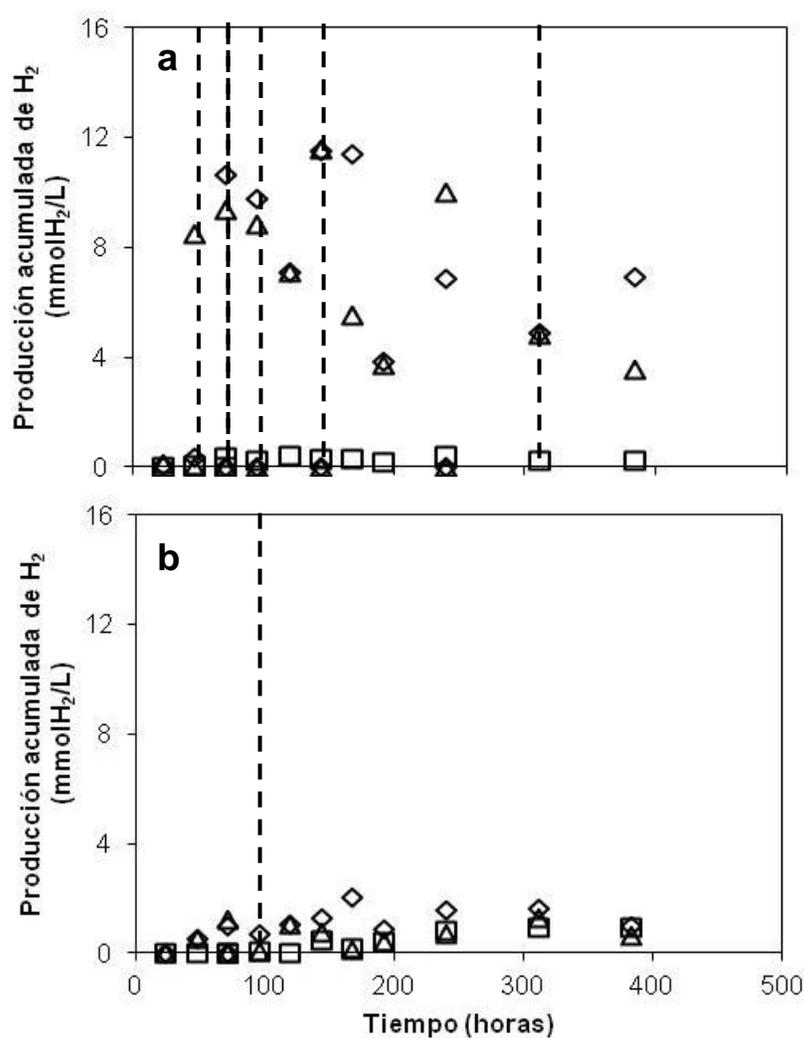


Figura 18. Producción fotoheterótrofa de H₂. a) *Rhodopseudomonas palustris* y b) Cultivo mixto. ◇ LF directo; △ dilución 1:2 del LF; □ Medio Pfenning. Líneas punteadas indican gaseado con argón.

La producción acumulada de H₂, fue 21.8 veces mayor con Rp que con M (Tabla 37). El LF no fue esterilizado, por lo que contenía una gran cantidad de microorganismos anaerobios. Se esperaba que el cultivo mixto soportaría mejor la introducción de otros microorganismos, pero todo indica que no.

Tabla 37. Producción acumulada de H₂, pH SST y SSV de los experimentos de fotoheterotrofia de licores fermentados

Reactor	P _H (mmol H ₂ /L)	pH final	SST (mg/mL)	SSV (mg/mL)
LF-M	2.01 ± 0.58	7.87 ± 0.28	1.21 ± 0.41	0.86 ± 0.15
LF-Rp	45.72 ± 7.93	8.43 ± 0.51	2.32 ± 0.28	1.90 ± 0.14
LF-1:2-M	1.86 ± 0.04	8.29 ± 0.08	0.90 ± ---	0.75 ± ---
LF-1:2-Rp	37.35 ± 11.84	7.89 ± 0.33	1.35 ± ---	0.42 ± ---
Rp	41.5 ± 5.9	8.2 ± 0.4	1.8 ± 0.7	1.2 ± 1.0
M	1.9 ± 0.1	8.1 ± 0.3	0.6 ± 0.9	0.4 ± 0.4
Mp-M	0.95 ± 0.38		0.74 ± 0.16	0.59 ± 0.09
Mp-Rp	0.64 ± 0.35	7.91 ± 0.53	0.97 ± ---	1.77 ± ---

Notas: LF-M: licor fermentado y cultivo mixto; LF-Rp: licor fermentado y *Rhodopseudomonas palustris*; LF-1:2-M: dilución 1:2 del licor fermentado y cultivo mixto; LF-1:2- Rp: dilución 1:2 del licor fermentado y *Rhodopseudomonas palustris*. Rp: resultados promedio de *Rhodopseudomonas palustris*; M: resultados promedio del cultivo mixto. Mp-M: medio Pfenning y cultivo mixto; Mp-Rp: medio Pfenning y *Rhodopseudomonas palustris*

El pH inicial de los reactores fue de 7.03, el pH final de todos los tratamientos fue cercano a 8 (Tabla 37). En este experimento se determinó la cantidad de sólidos suspendidos volátiles como una medida indirecta de la cantidad de biomasa microbiana, la biomasa en los reactores con Rp fue mayor que en los del cultivo mixto.

La producción con LF fue mayor que con medio Pfenning, esto pudo deberse a que a pesar de que tenían muy similar cantidad de ácidos orgánicos volátiles (Tabla 38), el LF pudo contener otros nutrientes que ayudaran al rápido crecimiento de las BPNS. El contenido de elementos traza en el medio de fermentación tiene un efecto en la producción de H₂ y varía dependiendo del tipo de microorganismo que se utilice (Liu *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2007)

No se detectó inhibición en la producción de H₂ debido al nitrógeno amoniacal del LF como se esperaba, esto pudo deberse a que Rp lo utilizó primero para su crecimiento y posteriormente se llevó a cabo la producción de H₂ a partir de los ácidos

orgánicos que se encontraban en el LF. En algunos trabajos se lleva a cabo el crecimiento de las BPNS y ya que se consumió el nitrógeno amoniacal se pasa el licor fermentado a otro reactor en donde se realiza la producción de H_2 . En este trabajo eso pudo llevarse a cabo en el mismo reactor.

Se observó alta producción acumulada de H_2 tanto en el suero de leche directo como en la dilución 1:2. Con la dilución 1:2 se obtuvo una producción 1.7 veces mayor que con el SL directo, $2.8 \text{ mmol } H_2/L_{LF} \cdot \text{día}$ y $4.7 \text{ mmol } H_2/L_{LF} \cdot \text{día}$ (considerando los 16 días que duró la fermentación), respectivamente. A pesar de esto, en el LF directo con Rp prácticamente se consumieron todos los ácidos orgánicos presentes.

La productividad obtenida en el RLF con suero de leche como sustrato fue de $4.5 \text{ mmol } H_2/L_{LF} \cdot \text{día}$ (considerando que como el TRH es de 1 día el volumen de lecho=volumen de suero de leche fermentado), si se le adiciona lo obtenido en la fotofermentación de suero de leche 1:2 se obtiene una producción de $9.2 \text{ mmol } H_2/L_{LF} \cdot \text{día}$ que es dos veces lo obtenido con la fermentación oscura.

Tabla 38. Productos microbianos solubles generados en la fermentación foroheterótrofa de licores fermentados.

Productos microbianos solubles (mg DQO/L)	LF	Mp	LF-M	LF-Rp	SLF-1:2-M	SLF-1:2-Rp	Mp-M	Mp-R
Ácido acético	302.8	618.8	ND	41.6 ± 29.6	24.0 ± 24.0	49.3 ± 12.0	66.5 ± ---	ND
Ácido propiónico	277.8	98.2	206.1 ± 57.7	ND	319.1 ± 64.3	250.6 ± 250.6	76.5 ± ---	ND
Ácido butírico	581.1	108.2	158.4 ± 43.9	ND	309.9 ± 180.9	51 ± 15.9	118.7 ± ---	35.8 ± 23.1
Acetona	166.0	ND	43.2 ± 18.5	146.3 ± 109.2	10.3 ± 23.8	89.9 ± 89.9	ND	ND
Metanol	122.4	ND	150.8 ± 46.8	251.6 ± 291.3	116.4 ± 1.5	152.6 ± 152.6	ND	ND
Etanol	22.4	ND	ND	ND	ND	32.1 ± 32.1	ND	ND
Butanol	12.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ac/PMS (%)	11.2	ND	7.6 ± 1.0	40.0 ± 38.7	12.8 ± 1.7	22.1 ± 22.1	ND	ND
MetOH/PMS (%)	8.2	ND	27.0 ± 0.3	48.7 ± 48.7	14.0 ± 4.7	21.9 ± 10.2	ND	ND
EtOH/PMS (%)	1.5	ND	ND	ND	ND	3.8 ± 3.8	ND	ND
BuOH/PMS (%)	0.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HAc/PMS (%)	20.4	75	ND	11.3 ± 10.7	2.2 ± 2.2	9.5 ± 6.6	25.4 ± ---	ND
HPr/PMS (%)	18.7	11.9	37.0 ± 0.7	ND	37.2 ± 5.6	32.7 ± 29.8	29.2 ± ---	ND
HBu/PMS (%)	39.1	13	28.5 ± 0.6	ND	33.7 ± 8.9	10.0 ± 7.5	45.4 ± ---	100 ± 0.0
A/B	0.5	5.7	---	---	0.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.6 ± ---	---
AOVT	1161.8	825.2	364.5 ± 101.6	41.6 ± 29.6	652.9 ± 279.1	350.9 ± 259.9	261.7 ± ---	35.8 ± 23.1
PMS	1485.2	825.2	558.5 ± 166.9	439.5 ± 152.6	879.6 ± 304.5	625.5 ± 309.6	261.7 ± ---	---
ρ, AOVT/SOLV	3.6	---	1.9 ± 0.1	0.1 ± 0.1	2.8 ± 0.9	1.2 ± 0.7	---	---

Notas: A/B: relación ácido acético-ácido butírico. Ac: acetona; MeOH: metanol; EtOH: etanol; BuOH: butanol; HAc: acetato; HPr: propionato; HBu: butirato; AOVT: ácidos orgánicos volátiles totales= HAc+HPr+HBu; PMS: productos microbianos solubles=AOVT+Ac+MeOH+EtOH+BuOH. En base: DQO/L. ND: no detectado. LF: licor fermentado; Mp: medio pfennig; LF-M: licor fermentado y cultivo mixto; LF-Rp: licor fermentado y *Rhodopseudomonas palustris*; LF-1:2-M: dilución 1:2 del licor fermentado y cultivo mixto; LF-1:2- Rp: dilución 1:2 del licor fermentado y *Rhodopseudomonas palustris*. Rp: resultados promedio de *Rhodopseudomonas palustris*; M: resultados promedio del cultivo mixto. Mp-M: medio Pfenning y cultivo mixto; Mp-Rp: medio Pfenning y *Rhodopseudomonas palustris*

7.7 Evaluación de la producción de H₂ a partir de la fermentación oscura de la mezcla de sustratos (SL-FORSU) en FASSH-VI

En la Figura 19 se muestra la dinámica de la producción de H₂ en FASSH-VI con la co-fermentación de sustratos. Se puede observar que solo en las unidades con 100% suero de leche se detectó un segundo ciclo de producción de H₂ muy similar al primero. Después del segundo gaseado no se observó producción de H₂ en ninguna unidad experimental.

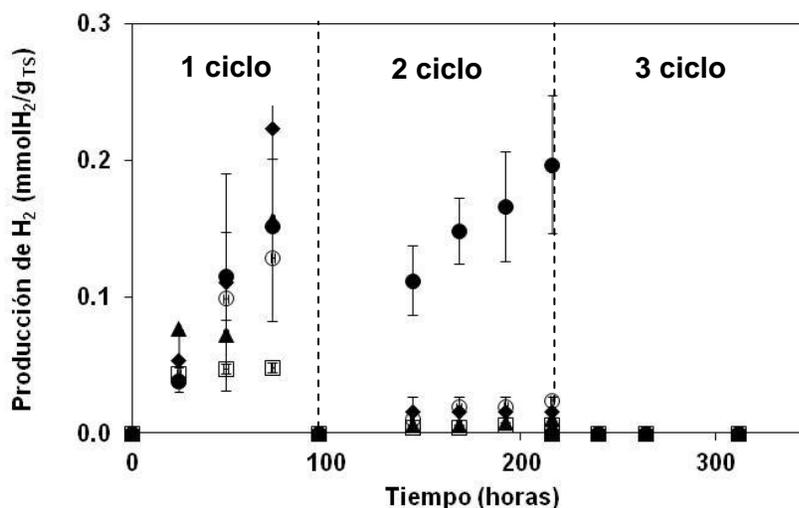


Figura 19. Producción acumulada de H₂ en FASSH-VI con co-fermentación de sustrato SL-FORSU. ○ 100/0 □ 70/30; ◆ 50/50; ■ 30/70 y ● 0/100. Las líneas punteadas indican el gaseado con N₂ y re-incubación

La producción total (contando los dos ciclos de producción) se muestra en la Tabla 39. Las unidades con 100% suero de leche o FORSU, funcionan como controles ya que en ellos no hay co-fermentación de sustrato. La mezcla de sustratos con la que se obtuvo mejor producción fue 50/50, siendo 1.5 veces mayor que con la mezcla 30/70 y 4.3 veces mayor que la mezcla 70/30.

En las mezclas de sustratos se tuvo un valor de pH muy cercano al que se ha reportado se puede iniciar la producción de solventes. Sin mezcla de sustratos el pH se mantuvo muy cercano al inicial, aún cuando se obtuvo mayor producción de H₂ con solo suero de leche.

Tabla 39. Producción acumulada de H₂

Unidad	Producción acumulada de H ₂ (mmol H ₂ /g ST)			pH inicial	pH final
	1 ciclo	2 Ciclo	Total		
100/0	0.129 ± 0.034	0.024 ± 0.004	0.153 ± 0.030	6.72	6.58 ± 0.01
70/30	0.048 ± 0.004	0.006 ± 0.001	0.055 ± 0.002	6.57	4.48 ± 0.19
50/50	0.224 ± 0.023	0.016 ± 0.011	0.240 ± 0.034	6.74	4.52 ± 0.13
30/70	0.157 ± 0.035	0.011 ± 0.010	0.168 ± 0.045	6.95	4.51 ± 0.14
0/100	0.152 ± 0.070	0.197 ± 0.051	0.349 ± 0.120	6.73	6.38 ± 1.44

Notas: 100/0: 100% FORSU; 70/30: 70%FORSU y 30% SL; 50/50: 50% FORSU y 50% SL; 30/70: 30% FORSU/70% SL; 0/100: 100% SL

El principal metabolito producido en todas las unidades fue el ácido acético (Tabla 40), teniendo así valores de A/B altos y mayores al umbral de 0.79 establecido en Robledo-Narváez *et al.*, 2013, con lo que se indica que la ruta de producción de H₂ que predomina es la de producción de ácido acético.

Tabla 40. Productos microbianos solubles generados en la fermentación de la mezcla de sustratos SL-FORSU

Productos microbianos solubles (mg DQO/L)	100/0	70/30*	50/50	30/70	0/100*
Ácido acético	28.38 ± 18.63	113.60 ± ---	24.60 ± 14.30	79.07 ± ---	5.24 ± ---
Ácido propiónico	7.30 ± ---	5.08 ± ---	2.16 ± 0.53	3.81 ± ---	6.69 ± ---
Ácido butírico	20.5 ± 17.3	2.23 ± ---	9.35 ± ---	2.15 ± 1.16	0.51 ± ---
Ácido láctico	ND	ND	ND	ND	ND
Acetona	ND	ND	ND	ND	ND
Metanol	10.2 ± 0.4	ND	5.50 ± 2.00	2.81 ± 1.53	0.67 ± ---
Etol	0.3 ± 0.04	0.41 ± ---	ND	3.41 ± ---	0.16 ± ---
Butanol	0.22 ± 0.03	0.34 ± ---	ND	2.82 ± ---	0.14 ± ---
MetOH/PMS	19.60 ± 13.4	ND	13.45 ± 5.78	31.95 ± 17.70	5.03 ± ---
EtOH/PMS (%)	0.51 ± 0.39	0.33 ± ---	ND	2.19 ± ---	1.23 ± ---
BuOH/PMS (%)	0.43 ± 0.32	0.28 ± ---	ND	1.81 ± ---	1.02 ± ---
HAc/PMS (%)	42.25 ± 0.49	93.39 ± ---	57.96 ± 30.17	82.37 ± 3.63	39.06 ± --
HPr/PMS (%)	8.95 ± 6.06	4.17 ± --	5.17 ± 0.90	4.07 ± 0.06	49.84 ± --
HBu/PMS (%)	28.24 ± 7.52	1.83 ± ---	23.40 ± ---	3.01 ± 1.56	3.83 ± ---
A/B	1.55 ± 0.40	51.03 ± ---	7.59 ± ---	31.95 ± 17.70	10.18 ± --
AOVT(mg DQO/L)	56.2 ± 43.8	121.00 ± ---	36.10 ± 5.10	85.0 ± ---	12.40 ± --
PMS (mg DQO/L)					
ρ, AOVT/SOLV	66.9 ± 43.3	121.70 ± ---	41.6 ± 3.1	94.1 ± ---	13.4 ± ---
	5.4 ± 4.30	163 ± ---	7.2 ± 3.5	8.7 ± 1.9	12.80 ± --

Notas: A/B: relación ácido acético-ácido butírico. EtOH: etanol; BuOH: butanol; HAc: acetato; HPr: propionato; HBu: butirato; AOVT: ácidos orgánicos volátiles totales= HAc+HPr+HBu; PMS: productos microbianos solubles=AOVT+EtOH+BuOH. En base: DQO/L. ND: no detectado

8 Conclusión

8.1 Actividad 1. Estudios preliminares del potencial hidrogenogénico del suero de leche en fermentación anaerobia

La productividad de H₂ usando suero de leche como sustrato fue 10 veces menor que usando sacarosa como sustrato.

8.2 Actividad 2. Superación de la inhibición de la producción de H₂

- La adición de NaCl al sustrato permitió el incremento de la productividad de H₂ de al menos tres veces comparada con la productividad obtenida con solo suero de leche
- El pseudo rendimiento de H₂ obtenido se encuentra en el rango intermedio de otras investigaciones que han realizado el proceso a temperaturas mayores.

8.3 Actividad 3. Producción de H₂ en lote utilizando suero de leche como sustrato

- La producción acumulada de H₂ a temperatura ambiente fue de aproximadamente el doble de la obtenida a 35°C.
- La temperatura de operación tuvo un efecto significativo en la producción acumulada de H₂
- Se observó un efecto significativo de la concentración del sustrato y el pH inicial en la producción de H₂ a ambas temperaturas.
- Los pseudo rendimientos obtenidos a ambas temperaturas se encuentran en el rango intermedio del reportado en literatura de fermentación de H₂ utilizando suero de leche como sustrato.

Con los resultados obtenidos, **se valida la hipótesis particular 1** que indica que “La producción de H₂ a temperatura ambiente será similar e incluso mayor que a 35° C, en fermentación en lote”.

8.4 Actividad 4. Estudio de la comunidad microbiana en los experimentos de fermentación oscura

- Los principales phyla detectados en las comunidades microbianas del RLF-A fueron: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria*. La abundancia relativa de cada phyla cambió con la variación del sustrato
- El phylum *Actinobacteria* fue relacionado con un mayor desempeño del RLF-A.
- La presencia de *Lactobacillus* fue relacionada con una baja productividad de H₂
- Se observó *Clostridium* en todas las etapas de operación.
- En la etapa con suero de leche y NaCl, se observó principalmente a *Clostridium* y *Bifidobacterium*.

8.5 Actividad 5. Estudios del potencial hidrogenogénico fotoheterotrófico de los licores fermentados

- La producción acumulada de H₂ fue 21.8 veces mayor con *Rhodopseudomonas palustris* que con el cultivo mixto
- La máxima producción acumulada de de H₂ se obtuvo con la dilución del licor fermentado y *Rhodopseudomonas palustris* (4.7 mmol H₂/L_{LF}*día). Esta producción sumada a la obtenida con el RLF-A es dos veces mayor que solo la fermentación oscura.

Con los resultados obtenidos, **se valida la hipótesis principal** que indica que “El proceso de fermentación oscura acoplada con foto-fermentación, utilizando suero de leche como sustrato, incrementará en al menos 50% la producción de hidrógeno comparada con solo la fermentación oscura”.

8.6 Actividad 6. Evaluación de la producción de H₂ a partir de la fermentación oscura de la mezcla de sustratos (SL-FORSU) en FASSH-VI

Con la mezcla de sustratos 50/50 se obtuvo 1.5 veces mayor producción acumulada de H₂ que con las mezclas 30/70 y 100% de FORSU; y 4.3 veces mayor que la mezcla 70/30.

Con los resultados obtenidos, **se valida la hipótesis particular 2** que indica que “En la fermentación oscura en estado sólido, el suero de leche en co-fermentación con la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) tendrá mayor producción de H₂ que solo el uso de FORSU como sustrato”.

9 Referencias

- Albertazzi, S.; Basile F, Brandin, J.; Einvall, J.; Hulteberg, C.; Fornasari, G.; Rosetti, V.; Sanati, M.; Trifiro, F.; Vaccari, A. (2005). The technical feasibility of biomass gasification for hydrogen production. *Catal Today*. 106: 297-300.
- Acevedo-Benitez, J.A. (2008). Producción de hidrógeno con un Cultivo Mixto de Microorganismos Fotoheterótrofos, a partir de lixiviados acidogénicos. CINVESTAV, México.
- Akkerman, I.; Janssen, M.; Rocha, J. & Wijffels, R.H. (2002). Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *Int J Hydrogen Energy*. 27: 1195–1208.
- Amos, W.A. (2004). Biological Water-Gas Shift Conversion of Carbon Monoxide to Hydrogen. Milestone completion report. NREL/MP-560-35592. *National Renewable Energy Laboratory*.
- Argun, H.; Kargi, F.; Kapdan, K.I.; Oztekin R. (2008). Batch dark fermentation of powdered wheat starch to hydrogen gas: effects of the initial substrate and biomass concentrations. *Int J Hydrogen Energy*. 33: 6109–6115.
- Argun, H.; Kargi, F. (2010). Photo-fermentative hydrogen gas production from dark fermentation effluent of ground wheat solution: Effects of light source and light intensity. *Int J Hydrogen Energy*. 35: 1595-1603.
- Argun, H.; Kargi, F. (2011). Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *Int J Hydrogen Energy*. 36: 7443-7459.
- Azbar, N.; Dokgoz F.T.C.; Tuba F.; Keskin, T.; Korkmaz, K.S. & Syed, H.M. (2009). Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *Int. J. Hydrogen Energy* 34. 7441–7447
- Azbar, N.; Dokgoz, F.T.C. (2010). The effect of dilution and L-malic acid addition on bio-hydrogen production with *Rhodospseudomonas palustris* from effluent of an acidogenic anaerobic reactor. *Int. J. Hydrogen Energy*. 35: 5028-5033.
- Azwar, M.Y.; Hussain, M.A.; Abdul-Wahab; A.K. (2014). Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. *Renew Sust Energ Rev*. 31: 158–173
- APHA (1992) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th ed. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF). Washington DC, EEUU.
- Barros, A.R.; de Amorim, E.L.C.; Reis, C.M., Shida, G.M.; Silva, E.L. (2010). Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: effect of support material and hydraulic retention time. *Int J Hydrogen Energy*. 35: 3379–3388.
- Basak, N.; Das, D. (2007) The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 23, 31–42
- Barros, A.R; de Amorim E.L.C.; Reis, C. M; Shida, G.M & Silva, E.L. (2010). Biohydrogen production in anaerobic fluidized bed reactors: Effect of support material and hydraulic retention time. *Int. J. Hydrogen Energy*. 35: 3379–3388.
- Ben-Hassan, R.M.; Ghaly, A.E. (1994). Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. *Appl Biochem Biotechnol*. 47:89–105.
- Bisaillon, A.; Turcot, J.; Hallenbeck, P. C. (2006). The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. *Int J Hydrogen Energy*. 31(11): 1504–1508
- BP Statistical Review of World Energy June 2014. <http://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/Energy-economics/statistical-review-2014/BP-statistical-review-of-world-energy-2014-full-report.pdf>. Revisado 19 de Septiembre de 2014.
- Brosius, J.; Dull, T.J.; Sleeter, D.D.; Noller, H.F.(1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. 148: 107–127.
- Cammack, R. (1999). Hydrogenase sophistication. *Nature* 397:214–215
- Calli, B.; Yukselen, M.A. (2004). Anaerobic treatment by a hybrid reactor. *Environ. Eng. Sci*. 19, 143–150.
- Calli, B.; Schoenmaekers, K.; Vanbroekhoven, K.; Diels, L. (2008). Dark fermentative H₂ production from xylose and lactosa effects of pH control. *Int J Hydrogen Energy*.33:522–30
- CANILEC. <http://www.canilec.org.mx/importaciones.html>

- Carrillo Aguado, J.L. (2006). Tratamiento y reutilización del suero de leche. Mundo Lácteo y Cárnico. Noviembre-Diciembre 27-30
- Caspeta, L.; Caro-Bermúdeza, M.A.; Ponce-Noyola, T.; Martinez, A. (2014). Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Appl Energ.* 277–286
- Castello, E.; Santos, C.G.Y; Iglesias, T.; Paolino, G.; Wenzel, J.; Borzacconi L.; Etchebehere, C. (2009). Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *Int J Hydrogen Energy.* 34(14):5674-5682.
- Cavinato, C.; Bolzonella, D.; Fatone, F.; Cecchi, F.; Pavan, P. (2011) Optimization of two-phase thermophilic anaerobic digestion of biowaste for hydrogen and methane production through reject water recirculation. *Bioresource Technol.* 102(18): 8605–8611.
- Chen, W.M.; Tseng, Z.J.; Lee, K.S.; Chang, J.S. (2005). Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *Int J Hydrogen Energy.* 30:1063–70.
- Cheng, C.H.; Hung, C.H.; Lee, K.S.; Liao, P.Y.; Liang, C.M.; Yang, L.H.; Lin, P.J.; Lin, C.Y. (2008). Microbial community structure of a starch-feeding fermentative hydrogen production reactor operated under different incubation conditions. *Int J Hydrogen Energy.* 33: 5242–5249
- Cheng, J.; Xia, A.; Liu, Y.; Lin, R.; Zhou, J.; Cen, K. (2012). Combination of dark- and photo-fermentation to improve hydrogen production from *Arthrospira platensis* wet biomass with ammonium removal by zeolite. *Int J Hydrogen Energy.* 37: 13330–13337.
- Chong, M.L.; Sabaratnam, V.; Shirai, Y. ; Hassan, M.A. (2009). Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy.* 34: 3277–3287
- Cogdell, R. J.; Gardiner, A. T.; Roszak, A. W.; Law, C. J.; Southall, J.; Isaacs, N. W. (2004). Rings, ellipses and horseshoes: how purple bacteria harvest solar energy. *Photosyn Res.* 81:207–14.
- Collet, C.; Schwitzguebel, J-P; Pleringer, P. (2003). Improvement of acetate production from lactose by growing *Clostridium thermolacticum* in mixed batch culture. *J Appl Microbiol* 2003; 95(4):824–31.
- Cordes, E.E.; Becker, E.L.; Hourdez, S.; Fisher, C.R. (2010). Influence of foundation species, depth, and location on diversity and community composition at Gulf of Mexico lower-slope cold seeps. *Deep-Sea Res II.* 57: 1870-81
- Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev Microbiol.* 3: 777–788
- Cunningham, A.E. 2000. Optimización De rendimientos de quesería.OEA
- Dabrock, B.; Bahl, H. y Gottschalk G. (1992). Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl Environ Microbiol.* 58:1233–9.
- Daeschel, M.A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology.* 43:164–167.
- Das, D; Veziroglu, T.N. (2001) Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int J Hydrogen Energy.* 26:13–28
- Das, D. (2009). Advances in biohydrogen production processes: An approach towards commercialization. *Int. J Hydrogen Energy.* 34: 7349–7357
- Das, D. ; Veziroglu, N.T. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *Int. J. Hydrogen Energy.* 33: 6046-6057
- De Amorim E.L.C.; Barros, A.R.; Damianovic, M.H.R.Z; Silva, E.L. (2009). Anaerobic fluidized bed reactor with expanded clay as support for hydrogen production through dark fermentation of glucose. *Int J Hydrogen Energy.*34: 783–90.
- Dębowski, M.; Korzeniewska, E.; Filipkowska, Z.; Zieliński, M.; Kwiatkowskib, R. (2014). Possibility of hydrogen production during cheese whey fermentation process by different strains of psychrophilic bacteria. *Int J Hydrogen Energy.* 39(5); 1072-1978
- De Man, C.; Rogosa, M. & Sharpe, M. (1960). A medium for cultivation of *Lactobacilli*. *J App Bacteriol.* 23, 130-5.
- De Philippis, R.; Ena, A.; Guastini, M.; Sili, C. & Vincenzini, M. (1992). Factors affecting poly- β -hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria and in purple non-sulfur bacteria. *FEMS Microbiol Rev.*103:187-94.
- De Vuyst, L. & Vandamme, E.J. (1994) Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, p. 91–142. In L. De Vuyst and E. J. Vandamme (ed.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications*. Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom.

- Deisenhofer, J.; Michel, H. (1989). The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *EMBO J.* 8:2149–69.
- Dincer, I. (2000). Renewable energy and sustainable development: a crucial review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 4: 157-175.
- Escamilla-Alvarado, C.; Ríos-Leal, E.; Ponce-Noyola, M.T.; Poggi-Varaldo, H.M. (2012). Gas biofuels from solid substrate hydrogenogenicmethanogenic fermentation of the organic fraction of municipal solid waste. *Process Biochemistry.* 47(11):1572-1587.
- Ergüder, T.H.; Tezel, U.; Guven, E. & Demirer, G.N. (2001). Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. *Waste Management.* 21. 643–650.
- Eroglu, E.; Melis, A. (2011) Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art. *Bioresource Technol.* 102: 8403-8413.
- Etchebehere C. (2002). Aplicaciones de técnicas de biología molecular al estudio de reactores. ¿Qué información se obtiene?, *VII Taller y Simposio Latinoamericano sobre Digestión Anaerobia (Sesión I Taller, 22 de Octubre)*, Mérida, Méx., 22-25 de Octubre.
- Fang, H.H.P.; Li, C.L. & Zhang, T. (2006). Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *Int J Hydrogen Energy.* 31: 683–92.
- Farizoglu, B.; Keskinler, B.; Yildiz E.; Nuhoglu, A. (2004). Cheese whey treatment performance of an aerobic jet loop membrane bioreactor. *Process Biochemistry* 39: 2283–2291
- Fascetti, E.; D'addario, E.; Todini, O.; Robertiello, A. (1998). Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes. *Int J Hydrogen Energy* 23:753–760
- Feng, G. L.; Letey, J.; Chang, A. C.; Mathews, M. C. (2005). Simulating dairy liquid waste management options as a nitrogen source for crops. *Agri Ecosys Environ.* 110:219–29
- Ferchichi, M.; Crabbe, E.; Gil, G.H.; Hintz, W. & Almadidy, A. (2005). Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *J. Biotechnol.* 120, 402–409
- Ferreira Rosa, P.R.; Santos, S.C.; Silva, E.L. (2014). Different ratios of carbon sources in the fermentation of cheese whey and glucose as substrates for hydrogen and ethanol production in continuous reactors. *Int. J. Hydrogen Energy.*39:1288–1296.
- Ferris, M.J.; Ward, D.M. (1997). Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1375–1381.
- Fierer, N.; Hamady, M.; Lauber, C.L.; Knight, R. (2008). The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(46): 17994–17999.
- Gadhamshetty, V.; Johnson, D.C.; Nirmalakhandan, N.; Smith, G.B.; Deng, S. (2009). Feasibility of biohydrogen production at low temperatures in unbuffered reactors. *Int J Hydrogen Energy.* 34:1233-43.
- García, G.M.; Revah, M.S.; Gómez, R.L.(1993). "Productos lácteos" en García Garibay M, Quintero Ramírez R, López-Munguía Canales A (edit.), *Biología Alimentaria*, Limusa Noriega Editores, México.153-223.
- Gest, H.; Kamen, M.D.; Bregoff. V. (1950). Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria. Photoproduction of hydrogen and nitrogen fixation by *Rhodospirillum rubrum*. *J Biol Chem.*182:153–70.
- Green, S.J. (2005). Don't panic. A guide to denaturing gradient gel electrophoresis. (www.stefangreen.com)
- Gogotov, I. N (1986). Hydrogenases of phototrophicmicroorganisms. *Biochimie.* 68:181–7.
- Hallenbeck, P.C.; Ghosh, D. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward?. *Trends in Biotechnology.* 27(5): 287-297.
- Hawkes, F.; Dinsdale, R.; Hawkes, D., Hussy, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. *Int J Hydrogen Energy.* 27:1339–47.
- Hawkes, F.R.; Hussy, I.; Kyazze, G.; Dinsdale, R.; Hawkes, D.L. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. *Int. J. Hydrogen Energy.*32:172–84.
- Heathcote, P.; Fyfe, P. K. Jones, M. R. (2002). Reaction centres: the structure and evolution of biological solar power. *Trends Biochem Sci.* 27:79–87.

- Horiuchi, J.; Shimizu, T.; Tada, K.; Kanno, T.; Kobayashi, M (2002) Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control. *Bioresource Technol.* 82(3): 209–213
- Huang, Y.; Zong, W.; Yan, X.; Wang, R.; Hemme, C.L.; Zhou, J.; Zhou, Z. (2010). Succession of the bacterial community and dynamics of hydrogen producers in a hydrogen-producing bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 3387–3390.
- Hung, C.-H.; Chang, Y.-T.; Chang, Y.-J. (2011). Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems – A review. *Bioresource Technol.* 102: 8437–8444
- Iza, J. (1991). Fluidized bed reactors for anaerobic wastewater treatment. *Water Sci Technol* 24:109–132.
- Jay, J.M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology.* 44: 525–32
- Jang, Y.-S.; Malaviya, A.; Cho, C.; Lee, J.; Lee, S.Y. (2012). Butanol production from renewable biomass by clostridia. *Bioresource Technol.* 123: 653–663
- Jiménez B. E. (2002). La contaminación Ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada. 2ª edición. Ed. Limusa. Cap. 9- 13.
- Jones, B.L.; Monty, K.J. (1979). Glutamine as a feedback inhibitor of the *Rhodospseudomonas sphaeroides* nitrogenase system. *J Bacteriol.* 139(3):1007–13.
- Kalinci, Y.; Hepbasli, A.; Dincer, I. (2009). Biomass-based hydrogen production: A review and analysis. *Int J Hydrogen Energy.* 34: 8799-8817
- Kapdan, I.K.; Kargi, F. (2006). Biohydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb Technol.* 38:569–82
- Kargi, F.; Eren, N.S.; Ozmihci, S. (2012). Bio-hydrogen production from cheese whey powder (CWP) solution: Comparison of thermophilic and mesophilic dark fermentations. *Int J Hydrogen Energy.* 37: 8338- 8342.
- Katano, T.; Fukui, M. (2003). Molecular inference of dominant picocyanobacterial populations by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified 16S rRNA gene fragments. *Phycol. Res.* 51, 71–76.
- Kataoka, N.; Miya, A.; Kiriya, K. (1997) Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria. *Water Sci Technol.* 36(6–7): 41–47.
- Kavacik, B.; Topaloglu, B. (2010). Biogas production from co-digestion of a mixture of cheese whey and dairy manure. *Biomass and Bioenergy.* 34(9):1321-1329.
- Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70: 337–349.
- Kern, M.; Klipp, W.; Klemme, J. H. (1994). Increased nitrogenase dependent H₂ photoproduction by hup mutants of *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Env Microbiol.* 60(6):1768–74.
- Kirk, R.S.; Sawyer, R.; Egan, H. (2005). “Composición y análisis de alimentos de Pearson”, CECSA, México. 583-632.
- Kisaalita, W.S.; Pinder, K.L. & Lo, K.V., 1987. Acidogenic fermentation of lactose. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 88–95.
- Koku, H.; Eroglu, I.; Gündüz, U.; Yücel, M.; Türker, M. (2002). Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Int J Hydrogen Energy.* 27: 1315:1329.
- Koskinen, P.E.; Kaksonen, A.H.; Puhakka, J.A. (2007). The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidized-bed bioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 97:742–58.
- Kothari R, Singh DP, Tyagi VV and Tyagi SK (2012) Fermentative hydrogen production – an alternative clean energy source. *Renew Sust Energy Rev.* 16: 2337–2346.
- Kusano, K.; Yamada, H.; Niwa, M.; Yamasato, K. (1997). *Propionibacterium cyclohexanicum* sp. nov., a New Acid-Tolerant w-Cyclohexyl Fatty Acid-Containing Propionibacterium Isolated from Spoiled Orange Juice. *Int J Systema Bacteriol.* 825-831
- Laurinavichene, T.V.; Belokopytov, B.F.; Laurinavichius, K.S.; Khusnutdinova, A.N.; Seibert, M.; Tsygankov, A.A. (2012). Towards the integration of dark- and photo-fermentative waste treatment. 4. Repeated batch sequential dark- and photofermentation using starch as substrate. *Int. J Hydrogen Energy.* 37: 8800-8810.
- Lee, K.; Lin, P.; Chang, J. (2006). Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. *Int. J. Hydrogen Energy.* 31(4): 465–472.
- Leite, J. A. C. ; Fernandes, B. S.; Pozzia, E.; Barboza, M. & Zaiata, M. (2008). Application of an anaerobic packed-bed bioreactor. for the production of hydrogen and organic acids. *Int. J. Hydrogen Energy.* 33: 579-586

- Levin, D. B.; Pitt, L.; Love, M. (2004). Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application. *Int J Hydrogen Energy*. 29(2):173–185.
- Leroy, F.; De Vuyst, L. (1999). The Presence of Salt and a Curing Agent Reduces Bacteriocin Production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a Potential Starter Culture for Sausage Fermentation. *Appl Environ Microb*. 5350–5356.
- Li, C. L.; Fang, H. H. P. (2007) Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Crit Rev Env Sci Technol*. 37(3): 1–39.
- Li, X.; Liu, T.; Wu, Y.; Zhao, G.; Zhou, Z. (2010). Derepressive Effect of NH_4^+ on Hydrogen Production by Deleting the *glnA1* Gene in *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnol & Bioeng*. 106 (4): 564-572
- Lin, C.-Y.; Lay, C.H. (2004) Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *Int. J Hydrogen Energy*. 29: 275–281.
- Lin, C.Y.; Lee, C.Y.; Tseng, I.C. & Shiao, I.Z. (2006). Biohydrogen production from sucrose using base-enriched anaerobic mixed microflora. *Process Biochem*. 41:915–9.
- Liu, B.-F.; Ren, N.-Q.; Ding, J.; Xie, G.-J.; Guo, W.-Q. (2009). The effect of Ni^{2+} , Fe^{2+} and Mg^{2+} concentration on photo-hydrogen production by *Rhodospseudomonas faecalis* RLD-53. *Int J Hydrogen Energy*. 34:721-726.
- Lo, Y.-C.; Chen, W.-M.; Hung, C.-H.; Chen, S.-D.; Chang, J.-S. (2008). Dark hydrogen fermentation from sucrose and xylose using hydrogen-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies. *Water Res*. 42, 827–842
- McLeod, F.A.; Guiot, S.R.; Costerton, J.W. (1990). Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge and filter reactor. *Appl. Environ. Microbiol*. 56(6):1598-1607.
- Malaspina, F.; Cellamare, C.M.; Stante, L. & Tilche, A. (1996). Anaerobic treatment of cheese whey with a downflow upflow hybrid reactor. *Biores Technol*.55:131–9.
- Manish, S.; Banerjee, R. (2008). Comparison of biohydrogen production processes. *Int J Hydrogen Energy*. 33: 279–86.
- Martinez-Perez, N.; Cherryman, S. J.; Premier, G.C.; Dinsdale, R.M.; Hawke, D.L.; Hawkes, F.R.I. (2007). The potential for hydrogen-enriched biogas production from crops: scenarios in the UK. *Biomass Bioenergy*. 31:95–104.
- Mawson, A.J. (1994). Bioconversion for whey utilisation and waste abatement. *Bioresour Technol*. 47, 195–203.
- Merriman, B.; Ion Torrent R&D Team; Rothberg, J.M. (2012). Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis*. 33: 3397–3417
- Miura, Y.; Hiraiwa, M.N.; Ito, T.; Itonaga, T.; Watanabe, Y.; Okabe, S. (2007). Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: relationship between community stability and reactor performance. *Water Res*. 41, 627–637.
- Miyake, J.; Tomizuk, N.; Kamibayashi, A. (1982). Prolonged photo hydrogen production by *Rhodospirillum rubrum*. *J Ferment Technol*. 60:199–203.
- Miyake, J.; Kawamura, S. (1987). Efficiency of light energy conversion to hydrogen by photosynthetic bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. *Int J Hydrogen Energy*. 12:147–149
- Mizuno O.; Dinsdale R.; Hawkes FR.; Hawkes DL.; Noike T. (2002). Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresource Technol*. 73 :59-65.
- Mockaitis, G.; Ratusznei, S. M.; Rodrigues, J. A. D.; Zaiat, M.; Foresti, E. (2006). Anaerobic whey treatment by a stirred sequencing batch reactor (ASBR): effects of organic loading and supplemented alkalinity. *J. Environ Management* 79, 198–206.
- Mohan, S.V. (2008). Fermentative hydrogen production with simultaneous wastewater treatment: influence of pretreatment and system operating conditions. *J. Sci. Indust. Res*. 67 (11): 950–961
- Mohan, S.V.; Babu, V.L.; Sarma, P.N. (2008). Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresource Technol*. 99 (1): 59–67
- Molinuevo-Salces, B.; Larsen, S.U.; Ahring, B.K.; Uellendahl, H. (2013). Biogas production from catch crops: Evaluation of biomass yield and methane potential of catch crops in organic crop rotations. *Biomass Bioenerg*. 59: 285–292
- Moreno-Medina. (2011). Reactores de ambientes combinados y su acoplamiento al hierro metálico para el tratamiento de efluentes contaminados con percloroetileno. CINVESTAV. México.

- Moreira Do Santos, Wagner Luiz. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *pediococcus* sp 347 de origen cárnico. Tesis Doctorado. Departamento de Nutrición y Bromatología III. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Madrid -España. 1993.
- Mu, Y.; Zheng, X.J.; Yu, H.Q.; Zhu, R.F. (2006). Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. *Int J Hydrogen Energy*. 31(6):780–5
- Muyzer, G.; de Waal, E. C.; Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Muyzer, G.; Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 127–141.
- Nath, A.; Dixit, M.; Bandiya, A.; Chavda, S.; Desai AJ. (2008). Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. *Biores Technol.* 99:5749–55
- Nath, K.; Muthukumar, M.; Kumar, A.; Das, D. (2008) Kinetics of two-stage fermentation process for the production of hydrogen. *Int. J. Hydrogen Energy*. 33, 1195– 1203.
- Nettles, C.G.; Barefoot, S.F. (1993). Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J Food Protection*. 56: 338–356.
- Ni, M; Leung, D.Y.; Leung, M.K.; Sumathy, K. (2006). An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Process Technol.* 87:461-72.
- Niemi, R.M.; Heiskanen, I.; Wallenius, K.; Lindstrom, K. (2001). Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J Microbio Methods*. 45: 155–165.
- Noike, T.; Takabatake, H; Mizuno, O; Ohba, M. (2002). Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *Int J Hydrogen Energy*. 27(11-12): 1367-71.
- Oh, S. E.; Van Ginkel, S.; Logan, B. E. (2003). The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environ. Sci. Technol.* 37: 5168-5190.
- Ozbay, N.; Putun, A.E.; Uzun, B.B.; Putun, E. (2001). Biocrude from biomass: pyrolysis of cotton seed cake. *Renew Energy*. 24:615–25.
- Panesar, P.S.; Kennedy, J.F.; Gandhi, D.N; Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chem*. 105, 1–14.
- Patel, P.; Patel, C. & Madamwar, D. (1999). Anaerobic upflow fixed-film bioreactor for biomethanation of salty cheese whey. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 76: 193–201.
- Perera, K.R.J.; Ketheesan, B.; Arudchelvam, Y.; Nirmalakhandan, N. (2012). Fermentative biohydrogen production II: Net energy gain from organic wastes. *Int J Hydrogen Energy*. 37(1): 167–178.
- Pielou, E.C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collection. *J Theoret. Biol.* 13, 131-144.
- Poggi-Valardo, H.M.; Rodríguez-Vázquez, R.; Fernández-Villagómez, G.; Esparza-García, F. (1997b) Inhibition of mesophilic solid substrate anaerobic digestion by ammonia nitrogen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 284-291.
- Poggi-Valardo, H.M.; Bárcenas-Torres, J.D.; Moreno-Medina, C.U.; García-Mena, J.; Garibay-Orijel, C.; Ríos-Leal, E.; Rinderknecht-Seijas, N. (2012). Influence of discontinuing feeding degradable cosubstrate on the performance of a fluidized bed bioreactor treating a mixture of trichlorophenol and phenol. *J. Environmental Management*. 113: 527-537.
- Poggi-Valardo, H.M. (2014). Comunicación personal.
- Prakasham, R.S.; Sathisha, T.; Brahmaiah, P.; Subba Rao, C.H.; Sreenivas Rao. R.; Hobbs, P.J. (2009). Biohydrogen production from renewable agri-waste blend: Optimization using mixer design. *Int J Hydrogen Energy*. 6143- 6148.
- Prospectiva del Mercado de Petróleo Crudo. (2007). Secretaría de Energía. http://www.sener.gob.mx/webSener/res/PE_y_DT/pub/Prospectiva%20Petroleo%20Crudo%20Fina%20s.pdf
- Qureshi, N.; Annous, B.A.; Ezeji, T.C.; Karcher, P. ; Maddox, I.S. (2005). Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. *Microb Cell Fact*. 4:24
- Ramachandran, R.; Menon, R.K. (1998). An overview of industrial uses of hydrogen. *Int. J. Hydrogen Energy*. 23(7): 593-598

- Ricotta, C.; Avena, G. (2003). On the relationship between Pielou's evenness and landscape dominance within the context of Hill's diversity profiles. *Ecological Indicators*. 2: 361-65
- Rittmann, B.E. (2008). Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 100: 203–212
- Rittmann, B.E.; Krajmalnik-Brown, R.; Halden, R.U. (2008). Pre-genomic, genomic and postgenomic study of microbial communities involved in bioenergy. *Nature reviews*. 6:604-612
- Reddy, C. S. K.; Ghai, R., Rashmi, V.; Kalia, C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Biores Technol.* 87:137-46.
- Redwood, M.D., Paterson-Beedl, M. & Macaskie, L.E. (2009) Integrating dark and light biohydrogen production strategies: towards the hydrogen economy. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 8(2): 149-185
- Robledo-Narváez. (2011). Producción de biohidrógeno a partir de residuos agroindustriales generados en la Cuenca del Papaloapan en el estado de Veracruz. CINVESTAV, México
- Robledo-Narváez, P.N.; Muñoz-Páez, K.M.; Ríos-Leal, E.; Calva-Calva, G.; Ortega-Clemente, L.A., Rinderknecht-Seijas, N.; Ponce-Noyola, M.T.; Salazar-Montoya, J.A.; Poggi-Varaldo, H.M. (2013) The influence of total solids content and initial pH on batch biohydrogen production by solid substrate fermentation of agroindustrial wastes. *J Environ Manage.* 128: 126–137.
- Rogalinski, T.; Ingram, T.; Brunner, G. (2008). Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. *J Supercrit Fluids*. 47: 54–63.
- Rosales-Colunga, L. M.; Razo-Flores, E.; Ordoñez, L. G.; Alatríste Mondragón, F.; De León Rodríguez, A. (2010). Hydrogen production by *Escherichia coli* DhycA DlacI using cheese whey as substrate. *Int. J Hydrogen Energy*. 35: 491-499
- Saddoud, A.; Hassairi, I. & Sayadi, S. (2007). Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. *Bioresource Technology*. 98: 2102– 2108.
- Saraphirom, P.; Reungsang, A. (2011). Biological hydrogen production from sweet sorghum syrup by mixed cultures using an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). *Int J Hydrogen Energy*. 36(14): 8765–8773.
- Sasikala, K.; Ramana, C. V.; Rao, P. R.; Subrahmanyam, M. (1990). Effect of gas phase on the photoproduction of hydrogen and substrate conversion efficiency in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. *Int J Hydrogen Energy*. 15(11):795–7.
- Saxena, R.C.; Adhikari, D.K.; Goyal, H.B. (2009). Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. *Renew Sust Energ Rev.* 13: 167–178
- Sekiguchi, H.; Tomioka, N.; Nakahara, T.; Uchiyama, H. (2001). A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnol. Lett.* 23: 1205–1208.
- Sekoai, P.T.; Gueguim Kana, E.B. (2014). Semi-pilot scale production of hydrogen from Organic Fraction of Solid Municipal Waste and electricity generation from process effluents. *Biomass Bioenerg.* 60: 156-163.
- Senge, M.O.; Smith, K. M. (1995). Biosynthesis and structures of the bacteriochlorophylls. In: Blankenship RE, Madigan MT, Bauer CE, editors. Anoxygenic photosynthetic bacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 137–51.
- Shanon CE. (1948). A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*. 27:379-423
- Shida, G.M.; Barros, A.R.; dos Reis, C.M.; de Amorim, E.L.C.; Damianovic, M.H.R.Z.; Silva, E.L. (2009). Long-term stability of hydrogen and organic acids production in an anaerobic fluidized-bed reactor using heat treated anaerobic sludge inoculum. *Int. J. Hydrogen Energy*. 34: 3679–3688.
- Siso, M. I. G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Biores Technol.* 57: 1–11.
- Suarez, E.; Lobo, A., Alvarez, S.; Riera, F.A.; Alvarez, R. (2006). Partial demineralization of whey and milk ultrafiltration permeate by nanofiltration at pilot-plant scale. *Desalination* 198, 274–281.
- Sweet WJ, Burris RH. 1981. Inhibition of nitrogenase Activity by NH_4^+ in *Rhodospirillum Rubrum*. *J Bacteriol.* 145(2):824–831
- Switzenbaum, M. S. (1983). Anaerobic fixed film wastewater treatment. *Enzyme Microb Technol* 5:242–250.
- Tao, Y.Z.; Chen, Y.; Wu, Y.Q.; He, Y.L.; Zhou, Z.H. (2007) High hydrogen yield from a two-step process of dark- and photo-fermentation of sucrose. *Int. J. Hydrogen Energy*. 32:, 200–206
- Tao, Y.; He, Y.; Wu, Y.; Liu, F.; Li, X.; Zong, W.; Zhou, Z. (2008). Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment. *Int J Hydrogen Energy*. 33(3):963– 973.

- Tuomisto, H. A consistent terminology for quantifying species diversity? Yes, it does exist. *Oecologia* (2010) 164:853–860
- Ueno, Y.; Haruta, S.; Ishii, M.; Igarashi, Y. (2001). Microbial community in anaerobic hydrogen producing microflora enriched from sludge compost. *Appl Microbiol Biotechnol.* 57:555–62.
- Valencia J. (2008). El suero de quesería y sus posibles aplicaciones. Mundo lácteo. Marzo/Abril. http://www.alimentariaonline.com/apadmin/img/upload/MLC023_suero.pdf
- Valencia-Denicia, E.; Ramírez- Castillo, M. L. (2009). La industria de la leche y la contaminación del agua. *Elementos: Ciencia y cultura.* 16 (73)enero-marzo:27-31
- Valdés L. L. A. Digestión anaerobia en sustrato sólido de residuos industriales y municipales. Cinvestav IPN. México. (1997).
- Valdez-Vazquez, I.; Ríos-Leal, E.; Esparza-García, F.; Cecchi, F.; Pavan, P.; Poggi-Varaldo, H.M. (2004). A review on hydrogen production with anaerobic mixed cultures. In: Pierucci S, editor. *Chem Eng Trans Ed. Milan, Italy.* AIDIC. 4:123–130.
- Valdez- Vazquez I.; Ríos-Leal E.; Muñoz- Páez K. M.; Carmona Martínez A.A.; Poggi-Varaldo H. M. (2006a) Effect of inhibition treatment, type of inocula and incubation temperature on H₂ production. *Biotechnol Bioeng.* 95(3):342-349.
- Valdez- Vazquez I.; Poggi-Varaldo H. M. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 13:1000-1013.
- Van Ginkel, S.; Sung, S.; Lay, J.J. (2001) Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science & Technol* 35: 4726–4730.
- Venetsaneas, N.; Antonopoulou, G.; Stamatielatu, K.; Kornaros, M .; Lyberatos, G. (2009). Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresource Technol.* 100 (15): 3713-3717.
- Wu, X.; Yao, W.; Zhu, J. (2010) Effect of pH on continuous biohydrogen production from liquid swine manure with glucose supplement using an anaerobic sequencing batch reactor. *Int J Hydrogen Energy.* 35(13): 6592–6599.
- Wright, C. A.; Cogdell, R. J.; Chance, B. (1978). Ion transport and electrochemical gradients in photosynthetic bacteria. In: Clayton RK, Sistrom WR, editors. *The photosynthetic bacteria.* New York: Plenum Press. 471–511.
- Whittaker, R.H. (1960) Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecol Monogr.* 30:279–338
- Whiteley, P.; Haracopos, D.; Knivsberg, A.M.; Reichelt, K.L.; Parlar, S.; Jacobsen, J.; Seim, A.; Pedersen, L.; Schondel, M.; Shattock, P. (2012). The ScanBrit randomised, controlled, single-blind study of a gluten- and casein-free dietary intervention for children with autism spectrum disorders. *Nutr Neurosci.* 13(2):87-100.
- Xia, A.; Cheng, J.; Lin, R.; Liu, J.; Zhou, J.; Cen, K. (2013). Sequential generation of hydrogen and methane from glutamic acid through combined photo-fermentation and methanogenesis. *Bioresource Technol.* 131: 146-151.
- Yang, P.; Zhang, R. H.; McGarvey, J.; Benemann J. R. (2007). Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *Int J Hydrogen Energy.* 32:4761–71.
- Yakunin, A. F.; Hallenbeck, P.C. (2002). AmtB is necessary for NH₄⁺ induced nitrogenase switch-off and ADP-ribosylation in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol.* 184(15):4081–4088.
- Yu, H.Q.; Zhu, Z.H.; Hu, W.R.; Zhang, H.S. (2002) Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *Int J Hydrogen Energy.* 27: 1359–65.
- Zárate-Segura, P.; García-Mena, J.; Poggi-Varaldo, H.M. (2005). Effect of biomass type and PCE on archaea communities of anaerobic reactors. In: Alleman, B.C., Kelley, M.E. (Eds.), *In Situ and On-Site Bioremediation-2005. Proceedings of the Eighth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium*(Baltimore, Maryland; June 6e9, 2005). Battelle Press, Columbus, OH, ISBN 1-57477-152-3. Book in CD-ROM.
- Zorin, N. A. (1986). Redox properties and active center of phototrophic bacteria hydrogenases. *Biochimie.* 68:97–101.
- Zhang, Z.P.; Tay, J.H.; Show, K.Y.; Yan, R.; Liang, D.T.; Lee, D. J.; Jiang, W. J. (2007). Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. *Int. J. Hydrogen Energy.* 32:185–91.

- Zhu, H. G.; Ueda, S.; Asada, Y.; Miyake J. (2002). Hydrogen production as a novel process of wastewater treatment - studies on tofu wastewater with entrapped R-sphaeroides and mutagenesis. *Int J Hydrogen Energy*. 27(11–12):1349–1357.
- Zhu, H.; Fang, H.H.P.; Zhang, T.; Beaudette ,L.A. (2007). Effect of ferrous ion on photo heterotrophic hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Int J Hydrogen Energy*. 32:4112-4108.
- Zhu, Y.; Yang, S.T. (2004) Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. *J Biotechnol*. 110(2): 143–157.
- Zhu, H.; Parker, W.; Basnar, R.; Proracki, A.; Falletta, P.; Béland, M.; Seto, P. (2009) Buffer requirements for enhanced hydrogen production in acidogenic digestion of food wastes. *Bioresource Technol*. 100(21): 5097–5102.
- Zumft, W. G.; Castillo, F. (1978). Regulatory properties of nitrogenase from *Rhodopseudomonas-Palustris*. *Arch Microbiol*. 117(1):53–60.

10 ANEXO . Artículos publicados

Journal of Environmental Management 95 (2012) S355–S359



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Environmental Management

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jenvman



Re-fermentation of washed spent solids from batch hydrogenogenic fermentation for additional production of biohydrogen from the organic fraction of municipal solid waste

Karla M. Muñoz-Páez^a, Elvira Ríos-Leal^b, Idania Valdez-Vazquez^a, Noemí Rinderknecht-Seijas^c, Héctor M. Poggi-Varaldo^{a,*}

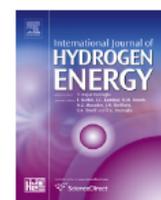
INTERNATIONAL JOURNAL OF HYDROGEN ENERGY 38 (2013) 12570–12579



Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/he



Comparison of biohydrogen production in fluidized bed bioreactors at room temperature and 35 °C



K.M. Muñoz-Páez^a, N. Ruiz-Ordáz^b, J. García-Mena^c, M.T. Ponce-Noyola^d, A.C. Ramos-Valdivia^d, I.V. Robles-González^e, L. Villa-Tanaca^b, J. Barrera-Cortés^d, N. Rinderknecht-Seijas^f, H.M. Poggi-Varaldo^{a,*}

Cheese whey as substrate of batch hydrogen production: Effect of temperature and addition of buffer

Waste Management & Research
2014, Vol. 32(5) 434–440
© The Author(s) 2014
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0734242X14527333
wmr.sagepub.com



KM Muñoz-Páez¹, HM Poggi-Varaldo¹, J García-Mena², MT Ponce-Noyola³, AC Ramos-Valdivia³, J Barrera-Cortés³, IV Robles-González⁴, N Ruiz-Ordáz⁵, L Villa-Tanaca⁵ and N Rinderknecht-Seijas⁶

Journal of Environmental Management 128 (2013) 126–137



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Environmental Management

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jenvman



The influence of total solids content and initial pH on batch biohydrogen production by solid substrate fermentation of agroindustrial wastes



Paula N. Robledo-Narváez^a, Karla M. Muñoz-Páez^a, Hector M. Poggi-Varaldo^{a,*}, Elvira Ríos-Leal^b, Graciano Calva-Calva^a, L. Alfredo Ortega-Clemente^c, Noemí Rinderknecht-Seijas^d, Carlos Estrada-Vázquez^e, M. Teresa Ponce-Noyola^a, J. Alfredo Salazar-Montoya^a

Biohydrogen, biomethane and bioelectricity as crucial components of biorefinery of organic wastes: A review

Waste Management & Research
2014, Vol. 32(5) 353–365
© The Author(s) 2014
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0734242X14529178
wmr.sagepub.com



Héctor M Poggi-Varaldo¹, Karla M Muñoz-Paez¹, Carlos Escamilla-Alvarado¹, Paula N Robledo-Narváez¹, M Teresa Ponce-Noyola¹, Graciano Calva-Calva¹, Elvira Ríos-Leal¹, Juvencio Galíndez-Mayer², Carlos Estrada-Vázquez³, Alfredo Ortega-Clemente⁴ and Noemí F Rinderknecht-Seijas⁵

