

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**Evaluación de la contribución hidrodinámica en  
la granulación microbiana en reactores EGSB  
hidrogenogénicos**

Tesis que presenta

**Christian Daniela Bárcenas Ruiz**

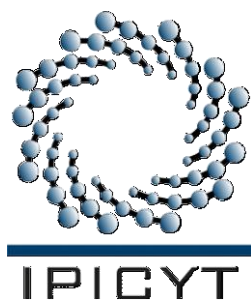
Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias Ambientales**

**Director de la Tesis:**

**Dr. Elías Razo Flores**

San Luis Potosí, S.L.P., Octubre de 2014



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Evaluación de la contribución hidrodinámica en la granulación microbiana en reactores EGSB hidrogenogénicos**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Christian Daniela Bárcenas Ruiz** y aprobada el **10 de Octubre de 2014** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

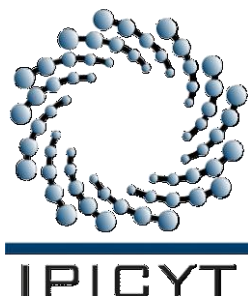
Dr. Elías Razo Flores  
(Director de la tesis)

---

Dr. Ma. de Lourdes Berenice Celis García  
(Miembro del Comité Tutorial)

---

Dr. Felipe Alatraste Mondragón  
(Miembro del Comité Tutorial)



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Elías Razo Flores.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 450148) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo de investigación fue financiado por el proyecto SEP-CONACYT CB 2009 01, 132483 “Producción de biohidrógeno en reactores de alta densidad celular” asignado al Dr. Elías Razo Flores



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 016 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 10 días del mes de octubre del año 2014, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Felipe Alatraste Mondragón</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. María de Lourdes Berenice Celis García</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Elías Razo Flores</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Julián Carrillo Reyes</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UNAM</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó la C.

**Christian Daniela Bárcenas Ruiz**

sobre la Tesis intitulada:

*Evaluación de la contribución hidrodinámica en la granulación microbiana en reactores EGSB hidrogenogénicos*

que se desarrolló bajo la dirección de

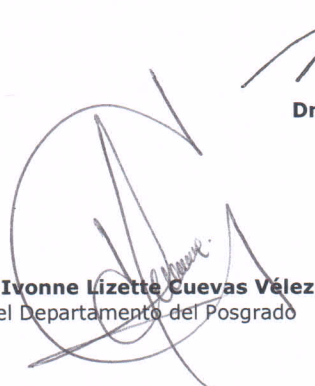
**Dr. Elías Razo Flores**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 19:20 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 10 días del mes de octubre de 2014.

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



*A todos los jóvenes atraídos  
por la ciencia y la investigación*

## **Agradecimientos**

Deseo expresar un profundo agradecimiento al Dr. Elías Razo Flores por haberme permitido realizar esta tesis, por su paciencia y dedicación. Al Dr. Felipe Alatríste Mondragón y a la Dra. Berenice Celis por el tiempo invertido, por sus valiosos aportes y constantes comentarios.

Al Dr. Julián Carrillo por su incondicional ayuda y gran amistad y a la Dra. Elisabeth Huber-Sannwald.

A los técnicos académicos de la División de Ciencias Ambientales, la M. en C. Dulce Isela de Fátima Partida Guitierrez, el M. en C. Guillermo Vidriales Escobar, el M. en C. Juan Pablo Rodas Ortiz, la M. en C. Elizabeth Cortez Cedillo, la I.Q. María del Carmen Rocha Medina por el apoyo brindado y a la M. en C. Ana Iris Peña Maldonado, de la División de Materiales

A todo el equipo de biohidrógeno, a mis compañeros Ale, Mariana, Marce, Esme y Tona, Aurora, Lalo, Emily y Charly.

A Ángel y Angelito por su amor.

## Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	x
Lista de figuras	xi
Resumen	xiii
Abstract	xiv
Capítulo 1. Introducción	1
1.1. Antecedentes	2
1.1.1. Situación actual de los combustibles	2
1.1.2. El hidrógeno	2
1.1.3. Producción de hidrógeno	3
1.1.4. Fermentación oscura	4
1.1.5. Inóculos	6
1.1.6. Pretratamiento del inóculo	7
1.1.7. Reactores usados en la fermentación oscura	8
1.1.8. Proceso de la granulación microbiana	9
1.1.8.1. Modelo termodinámico sobre la formación de gránulos	9
1.1.8.2. Modelo de microcolonia sintrófico	10
1.1.8.3. Sustancias poliméricas extracelulares	10
1.1.8.4. Teoría de la presión de selección	11
1.1.8.5. Gránulos productores de hidrógeno	12
1.2. Justificación	14
1.3. Hipótesis	15
1.4. Objetivos	15
Capítulo 2. Materiales y métodos	16
2.1. Materiales	16
2.1.1. Inóculo	16
2.1.2. Medio de cultivo	16
2.1.3. Reactores	16
2.2. Metodología	16

2.2.1. Estrategias de eliminación de metanogénesis	17
2.2.1.1. Tratamiento térmico	17
2.2.1.2. Lavado celular	17
2.2.2. Condiciones de operación de los reactores EGSB	18
2.2.3. Métodos analíticos	19
2.2.3.1. Producción y composición del gas	19
2.2.3.2. Determinación de ácidos grasos volátiles	20
2.2.3.3. Determinación de sólidos totales y suspendidos volátiles	20
2.2.3.4. Determinación de carbohidratos totales	20
2.2.3.5. Caracterización de la biomasa granular	21
2.2.3.5.1. Características físicas y químicas	21
2.2.3.5.1.1. Morfología	21
2.2.3.5.1.2. Diámetro y granulometría	22
2.2.3.5.1.3. Velocidad de sedimentación	22
2.2.3.5.1.4. Sustancias Poliméricas extracelulares	23
2.2.3.5.1.4.1. Extracción de sustancias Poliméricas extracelulares	23
2.2.3.5.1.4.2. Análisis de proteínas y carbohidratos	24
2.2.3.5.2. Características biológicas	24
2.2.3.5.2.1. Actividad hidrogenogénica	24
Capítulo 3. Resultados y Discusión	26
3.1. Desempeño de reactor CSTR	26
3.2. Desempeño de los reactores EGSB	27
3.3. Composición de metabolitos de los reactores EGSB	33
3.4. Eficiencia de consumo de glucosa y rendimiento molar	36
3.5. Balances de DQO	37
3.6. Características físicas de los gránulos	41
3.6.1. Color del gránulo	41
3.6.2. Morfologías microscópicas	42
3.6.3. Velocidades de sedimentación	44
3.6.4. Tamaño del gránulo	47
3.7. Características químicas de los gránulos	50
3.7.1. Sustancias poliméricas extracelulares	50



3.8. Características biológicas	51
3.8.1. Actividad hidrogenogénica	51
3.9. Efecto de la velocidad ascensional	56
Capítulo 4. Conclusiones y perspectivas	59
4.1. Conclusiones	59
4.2. Perspectivas	60
Capítulo 5. Referencias	61

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Velocidades ascensionales ( $V_{up}$ ) de los 4 reactores EGSB con sus respectivos flujos de recirculación ( $Q_r$ ).	19
<b>Tabla 2.</b>	Comparación de la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno y rendimientos molares usando reactores EGSB.	32
<b>Tabla 3.</b>	Densidad de los gránulos de los reactores EGSB1, EGSB3 y EGSB4.	46
<b>Tabla 4.</b>	Parámetros obtenidos al ajustar las cinéticas de producción de hidrógeno de los inóculos y los gránulos al final de la operación de los reactores EGSB, al modelo de Gompertz.	54

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b>	Rutas metabólicas de la fermentación de la glucosa. Fdox, ferredoxina oxidada; Fdred, ferredoxina reducida; 2A, oxidación de Fdred/Fdox acoplada a la reducción de NAD <sup>+</sup> /NADH <sub>2</sub> ; 2B, oxidación de Fdred/Fdox acoplada a la reducción de H <sup>+</sup> /H <sub>2</sub> . NADH <sub>2</sub> es NADH + H <sup>+</sup> . Tomada de Lee et al. (2007).	5
<b>Figura 2.</b>	A) Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno, VVPH (■) obtenida, durante el tiempo de operación del reactor CSTR y velocidad de carga orgánica aplicada, VCO (-); B) concentración de sólidos suspendidos volátiles en el efluente, SSV (●).	26
<b>Figura 3.</b>	Perfiles de velocidad volumétrica de producción de hidrógeno, VVPH (■) y de pH (Δ), durante la operación de los reactores EGSB1 (A), EGSB2 (B), EGSB3 (C) y EGSB4 (D).	30
<b>Figura 4.</b>	Perfiles de composición de H <sub>2</sub> (*) y CO <sub>2</sub> (●) en el gas producido a través del tiempo de operación de los reactores EGSB1 (A), EGSB2 (B), EGSB3 (C) y EGSB4 (D).	31
<b>Figura 5.</b>	Concentraciones de ácidos grasos volátiles durante la operación de los reactores EGSB1 (A), EGSB2 (B), EGSB3 (C) y EGSB4 (D). Acetato (◆), propionato (▲), butirato (x) y formiato (●).	35
<b>Figura 6.</b>	Eficiencia de consumo de glucosa (◇) y rendimiento molar de hidrógeno (■) durante la operación de los reactores EGSB1 (A), EGSB2 (B), EGSB3 (C) y EGSB4 (D).	38
<b>Figura 7.</b>	Concentración de sólidos suspendidos volátiles en el efluente de los reactores EGSB2 (A), EGSB3 (B) y EGSB4 (C).	39
<b>Figura 8.</b>	Balances de DQO durante la operación de los reactores EGSB1 (A), EGSB2 (B), EGSB3 (C) y EGSB4 (D). Formiato (■), Acetato (■), Propionato (///), Butirato (■), Glucosa residual (■), Hidrógeno (■), No determinado (□)	40
<b>Figura 9.</b>	Fotografías tomadas del fondo de los reactores EGSB y color de los gránulos obtenidos a los 24 días de operación de los reactores EGSB1 (A), EGSB2 (B), EGSB3 (C) y EGSB4 (D).	41
<b>Figura 10.</b>	Imágenes de SEM de los gránulos al final de la operación (24 días) de los reactores EGSB1 (A), EGSB2 (B y C), EGSB3 (D) y EGSB4 (E). Bacilos (flecha azul), cocos (flecha amarilla), canales (flecha roja).	43
<b>Figura 11.</b>	Velocidades de sedimentación alcanzadas por los gránulos en relación a su diámetro obtenidos de los reactores EGSB1 (A), EGSB3 (B) y EGSB4 (C).	45
<b>Figura 12.</b>	Distribución de tamaños de los gránulos hidrogenogénicos a los 24 días de operación de los reactores EGSB1 (A), EGSB2 (B), EGSB3 (C) y EGSB4 (D).	49
<b>Figura 13.</b>	Relación proteínas/carbohidratos de la gránulos obtenidos de los reactores EGSB1, EGSB2, EGSB3 y EGSB4.	51
<b>Figura 14.</b>	Volumen acumulado de hidrógeno (■) del inóculo sometido a tratamiento térmico, IT1 (A), los gránulos obtenidos del reactor EGSB1 (B), el inóculo	55

sometido a lavado en CSTR, IT2 (C) y, los gránulos obtenidos del reactor EGSB2 (D). Modelo de Gompertz (-).

**Figura 15.** Volumen acumulado de hidrógeno (■) de las cinéticas realizadas a: (A) los gránulos obtenidos del reactor EGSB3 y, (B) los gránulos obtenidos del reactor EGSB4. Modelo de Gompertz (-). 56

**Figura 16.** Distribución de los ácidos grasos volátiles obtenidos al final de las actividades hidrogenogénicas del inóculo sometido a tratamiento térmico IT1 (A), y el sometido a lavado en CSTR IT2 (B), gránulos de los reactores EGSB1 (C), EGSB2 (D), EGSB3 (E) y EGSB4 (F). 57

## Resumen

### **Evaluación de la contribución hidrodinámica en la granulación microbiana en reactores EGSB hidrogenogénicos**

Los agregados microbianos, tales como los gránulos y biopelículas, juegan un papel importante en los sistemas anaerobios de producción de energía (hidrógeno y metano). En el presente trabajo se estudió el efecto que tiene la hidrodinámica en la formación de lodos granulares, empleando reactores de lecho de lodo granular expandido (EGSB, por sus siglas en Inglés, Expanded Granular Sludge Bed). Se aplicaron dos tipos de pretratamiento del inóculo, térmico y lavado celular (reactores EGSB1 y 2), evaluándose el efecto de diferentes velocidades ascensionales (2.5, 3.5 y 4.5 m/h, para los reactores EGSB1 y 2, EGSB3 y EGSB4, respectivamente) en la formación de los gránulos. Todos los reactores se alimentaron con glucosa como sustrato, a una velocidad de carga orgánica de 25.6 g DQO/L/d, un TRH de 10 h, una temperatura de 25°C y un pH de 5.5 por 24 días. Los resultados obtenidos señalan que la velocidad ascensional de 4.5 m/h mostró mayor velocidad volumétrica de producción de hidrógeno (VVPH) con un valor promedio de 1.19 L H<sub>2</sub>/L/d y el mejor rendimiento con un valor de 0.46 mol H<sub>2</sub>/mol de sustrato. En todos los experimentos se obtuvieron gránulos de color crema-café, y solo en el reactor EGSB2 fueron totalmente de color crema. Se encontraron gránulos con diámetros de hasta 2.2 mm en el EGSB3 y 2 mm en el EGSB4. Las imágenes de SEM revelaron en todos los gránulos morfologías de tipo bacilares y cocos. Se observó que la relación proteínas/carbohidratos (P/C) aumentó conforme se incrementó la velocidad ascensional siendo estos valores de 0.12, 0.23 y 0.33 para el EGSB1, EGSB3 y EGSB4, respectivamente. En cuanto al diámetro de los gránulos obtenidos, en el EGSB1 fueron más abundantes los de menor tamaño (40-366 µm), mientras que, conforme se aumentó la velocidad ascensional se observó un incremento en la cantidad de gránulos de mayor tamaño, de entre 583 y 2259 µm para el EGSB3 y de entre 583 y 2005 µm para el EGSB4. Las velocidades de sedimentación de los gránulos estuvieron entre 8.04 m/h para los gránulos de menor tamaño, y hasta de 27 m/h para los de mayor tamaño. Las densidades de los gránulos variaron entre 998 y 1003 Kg/m<sup>3</sup>. La actividad hidrogenogénica específica fue mayor para los gránulos del EGSB4, 424.29 mL H<sub>2</sub>/g SSV/d. Los principales metabolitos secundarios en el efluente fueron formiato, acetato, butirato y propionato, siendo este último el de mayor concentración en todos los reactores. La resistencia mecánica de los gránulos formados usando biomasa sometida a lavado celular (EGSB2) fue muy baja, lo que provocó que se desintegraran durante su manipulación; así mismo, también mostraron los menores valores de actividad hidrogenogénica específica con 43.09 mL H<sub>2</sub>/g SSV/d. El presente trabajo demuestra de manera clara el papel que juega la hidrodinámica (velocidad ascensional) en la formación, características y desempeño de los gránulos hidrogenogénicos.

**PALABRAS CLAVE.** Producción fermentativa de hidrógeno, velocidad ascensional, gránulos, reactores EGSB.

## Abstract

### Evaluation of the hydrodynamic contribution on the microbial granulation in hydrogenogenic EGSB reactors

Microbial aggregates, such as biofilms and granules, play a key role in the energy producing anaerobic systems. In the present work the effect of the hydrodynamic conditions on the development of granular sludge using expanded granular sludge bed (EGSB) reactors was studied. Two types of inoculum pretreatment were applied, heat treatment and biomass wash-out (EGSB1 and 2), evaluating the effect of the up-ward liquid velocity (2.5, 3.5 and 4.5 m/h, for EGSB1 and 2, EGSB3 and EGSB4, respectively), in the formation of granules. All the experiments were performed in EGSB reactors fed with glucose as substrate at an organic loading rate of 25.6 g COD/L/d, a HRT of 10 h, 25 ° C, and a pH of 5.5 during a total operation period of 24 days. The results obtained indicate that the up-ward liquid velocity of 4.5 m/h showed a better volumetric hydrogen production rate than the other reactors with 1.19 L H<sub>2</sub>/L/d, and the best hydrogen yield of 0.46 mol H<sub>2</sub>/mol of substrate. In all the experiments creamy-brown color granules were obtained, and only in the EGSB2 were completely cream. Granules with diameter up to 2.2 mm, in EGSB3, and up to 2 mm, in EGSB4, were found. In the granules of all reactors, SEM images revealed bacillary and coccoid morphologies. It was observed that the protein/carbohydrate (P/C) ratio increased as the up-ward liquid velocity was increased; these values were 0.12, 0.23 and 0.33, for EGSB1, EGSB3 and EGSB4, respectively. Regarding the diameter of the granules, in EGSB1 were more abundant the smaller ones (40-366 µm), whereas as the up-ward liquid velocity was increased larger granules were observed (583-2259 µm and 583-2005 µm for EGSB3 and EGSB4, respectively). The settling velocities of the granules were between 8.04 m/h, for the smaller granules, and up to 27 m/h for the largest ones. The densities of the granules varied between 998 and 1003 kg/m<sup>3</sup>. The specific hydrogenogenic activity was greater for the EGSB4 granules, 424.29 mL H<sub>2</sub>/g SSV/d. The main metabolites produced were formate, acetate, butyrate and propionate, being the latter the one with the highest concentration in all reactors. The mechanical strength of the granules formed using biomass subjected to cell wash-out (EGSB2) was very weak, leading to disintegration during handling, likewise these granules also showed the lowest values of specific hydrogenogenic activity, 43.09 mL H<sub>2</sub>/g SSV/d. The present work clearly demonstrated the key role of the hydrodynamics (up-ward liquid velocity) on the formation, characteristics and performance of the hydrogenogenic granules.

**KEY WORDS.** Fermentative hydrogen production, up-ward liquid velocity, granules, EGSB reactors.

# Capítulo 1. Introducción

La gran cantidad de problemas ambientales asociados al uso de combustibles fósiles y la preocupación por satisfacer las necesidades energéticas actuales y futuras de nuestra sociedad, han conducido a la búsqueda de energías sostenibles y amigables con el ambiente. El hidrógeno cuando es producido a partir de fuentes renovables, es considerado un combustible limpio. La producción de hidrógeno a través de la fermentación, se basa en el uso de microorganismos para transformar sustancias ricas en carbohidratos y en ausencia de oxígeno, donde el hidrógeno es formado como producto secundario, junto con ácidos orgánicos y alcoholes. Sin embargo este proceso aun no es económicamente rentable; por lo tanto, es de gran importancia el estudio de los procesos de producción de hidrógeno para así poder superar las barreras existentes. En los reactores granulares de lecho expandido, generalmente la biomasa forma agregados microbianos denominados gránulos, que permiten buena concentración de biomasa dentro del reactor, permitiendo así la aplicación de altas cargas orgánicas y por lo tanto mayor producción del gas. El proceso de formación de gránulos es de gran complejidad y es conocido como granulación, la cual consiste en la aglomeración de biomasa suspendida en la que existen interacciones químicas, físicas y biológicas entre diferentes grupos tróficos. La principal desventaja de este proceso son los largos tiempos necesarios para que el gránulo maduro se forme. Se han hecho estudios acerca de cómo el esfuerzo de corte afecta la granulación aerobia y anaerobia y se ha observado que entre mayor sea el esfuerzo de corte, la biomasa tiende a producir mayor cantidad de sustancias poliméricas extracelulares, las cuales son productos metabólicos bacterianos que se acumulan en la superficie celular y forman una capa protectora para las células cuando las condiciones ambientales no son las adecuadas. Así mismo se cree que estos exopolímeros ayudan a reforzar la unión entre bacterias, la cual se inicia por interacciones fisicoquímicas. En esta tesis se estudiará el papel que juega la hidrodinámica, específicamente la velocidad ascensional de líquido, en la formación de gránulos hidrogenogénicos.

## 1.1. Antecedentes

### 1.1.1. Situación actual de los combustibles

Los recursos energéticos son imprescindibles para satisfacer las necesidades básicas del hombre. Sin embargo, las fuentes de energía convencionales que consisten en combustibles fósiles, además de conducir a impactos ambientales negativos como el calentamiento global (Rosen et al. 2008; Veziroglu et al. 2008), tienen un papel decisivo en el desarrollo de cada país, ya que actualmente representan el sistema energético donde se sustenta su desarrollo económico y social. Si a esto se le suma la creciente preocupación por lograr abastecer a la población mundial con combustibles fósiles en un futuro no muy lejano, nos encontramos ante un escenario en el que es necesaria una transición energética. Esta transición consiste en un proceso de cambio en los modelos actuales de producción y utilización de energía, hacia sistemas más equitativos, mejor distribuidos, y menos contaminantes. Actualmente, debido a la creciente emisión de gases de efecto invernadero, los estudios en materia de energía se han enfocado en el desarrollo de combustibles limpios y renovables, como es el caso de la energía eólica, solar, hidráulica, geotérmica, oceánica y bioenergía (Alatorre et al. 2009). La bioenergía consiste en la utilización de biomasa para producir energía como los biocombustibles gaseosos (hidrógeno y/o metano). Se cree que el hidrógeno jugará un papel clave en la sustitución de los combustibles fósiles (Do Sacramento et al. 2008), ya que con el tiempo podría contribuir al desarrollo sostenible de los países en vías de desarrollo. Manzini et al. (2001) estudiaron la reducción de gases de efecto invernadero en México, al usar energías renovables en un horizonte al año 2025 y concluyeron que el hidrógeno es la mejor opción política energética.

### 1.1.2. El hidrógeno

El hidrógeno es un elemento químico ligero, estable y poco reactivo a temperatura ambiente (Perna et al. 2011). Es el tercer elemento más abundante del universo,



en el planeta se encuentra comúnmente combinado con otras moléculas y en condiciones ambientales, el hidrógeno molecular se encuentra en estado gaseoso (Valenzuela et al. 2009). Se usa como materia prima para la eliminación de azufre en la refinación del petróleo, en la industria química para síntesis de metanol y amoníaco, en la industria metalúrgica, electrónica (para semiconductores) y en el procesamiento de alimentos. Además, como puede ser usado en la industria del transporte, así como en la generación de electricidad y de calor, es considerado un acarreador energético con un alto rendimiento de 122 kJ/g que es casi 2.75 veces mayor que la energía obtenida al usar hidrocarburos (Li et al. 2009). Durante su combustión y su uso en celdas de combustible, se produce sólo agua y calor lo que lo hace un combustible limpio sin emisiones de gases de efecto invernadero.

### 1.1.3. Producción de hidrógeno

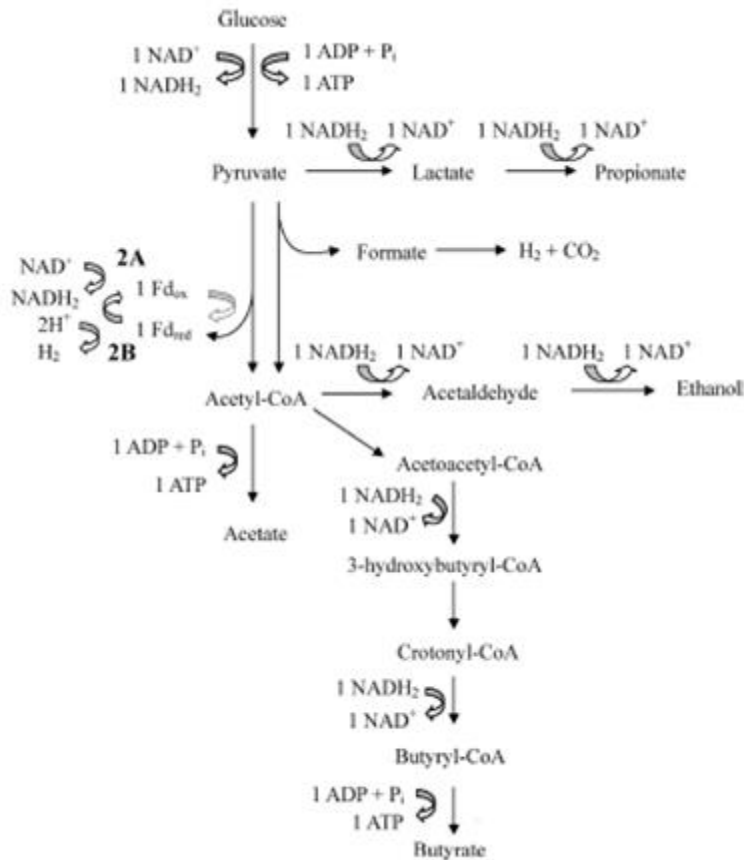
A diferencia del carbón, el gas natural, y el petróleo, el hidrógeno no es una fuente de energía primaria, es decir debe ser producido usando energía de otra fuente, por lo que se considera un acarreador energético secundario. El hidrógeno se puede obtener a partir del agua, mediante la electrólisis, en donde ésta se descompone en sus constituyentes por medio de una reacción electroquímica. En base a procesos avanzados de alta temperatura, el hidrógeno también se puede producir a partir de la biomasa y del carbón (después de la gasificación) y, del gas natural por medio de reformación de vapor de agua, siendo este último el principal modo de producción (Conte et al. 2001). Su obtención actual por estos procesos termoquímicos es caracterizada por los altos requerimientos energéticos de combustibles fósiles y la liberación de gases de efecto invernadero. Por lo tanto, la única alternativa amigable con el ambiente, es su producción a través de la llamada tecnología verde, que consiste en la producción biológica usando diversas especies microbianas y biomasa. Los procesos biológicos para producción de hidrógeno se pueden dividir de acuerdo al uso o no de la luz solar: los procesos que usan la luz del sol son la biofotólisis directa e indirecta y la fotofermentación; y

el proceso que no la usa, es la llamada fermentación oscura (Reith et al. 2003). La biofotólisis consiste en la disociación biológica del agua en sus componentes, usando cianobacterias y algas verdes a partir de la luz solar. La fotofermentación es la conversión de compuestos orgánicos a hidrógeno usando bacterias fotosintéticas. La fermentación oscura es uno de los principales procesos biológicos en donde los microorganismos usan sustancias ricas en carbohidratos para producir hidrógeno. Entre sus ventajas destacan la posibilidad de una operación rápida, gracias al diseño simple de los reactores, el uso de distintos sustratos incluyendo desechos orgánicos, y la disponibilidad de los microorganismos para realizar la fermentación. Además, al no necesitar luz, disminuyen los costos de operación en comparación con los procesos biológicos que dependen de ella (Levin et al. 2004).

#### 1.1.4. Fermentación oscura

Casi todos los procesos de la vida derivan su energía de reacciones redox ya sea directa o indirectamente. La fermentación es una reacción de oxidación-reducción en la que parte de los compuestos que actúan como sustrato o fuente de energía se reducen, mientras otros se oxidan, donde el resultado final es la síntesis de ATP. Es un proceso anaerobio que usa sólo fosforilación a nivel de sustrato con una generación neta de 2 ATP por cada molécula de glucosa (Figura 1). La pequeña cantidad de ATP generada se debe a que no hay uso de cadenas de transporte de electrones, ni la necesidad de aceptores externos ( $O_2$ ,  $NO_3$  y  $Fe^{3+}$ ). El  $NAD^+$  es el intermediario clave que actúa como transportador de electrones y se reduce a NADH en las reacciones redox de la fermentación. Sin embargo al volver a oxidarse a  $NAD^+$ , el piruvato es reducido terminando usualmente en la producción de hidrógeno,  $CO_2$ , ácidos orgánicos o alcoholes y en muy pequeñas cantidades de energía; es decir, los electrones extraídos del sustrato son eliminados gracias a la producción de estos metabolitos secundarios (Maier et al. 2009). La producción de hidrógeno está asociada generalmente a una ferrosulfoproteína llamada ferredoxina que permite el transporte de electrones

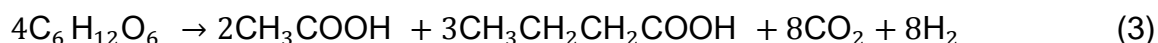
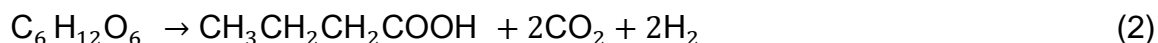
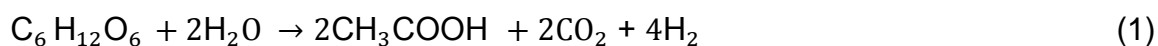
hasta los iones  $H^+$ , derivados principalmente del agua, transporte catalizado por la enzima hidrogenasa.



**Figura 1.** Rutas metabólicas de la fermentación de la glucosa. Fdox, ferredoxina oxidada; Fdred, ferredoxina reducida; 2A, oxidación de Fdred/Fdox acoplada a la reducción de  $NAD^+/NADH_2$ ; 2B, oxidación de Fdred/Fdox acoplada a la reducción de  $H^+/H_2$ .  $NADH_2$  es  $NADH + H^+$ . Tomada de Lee et al. (2007).

La cantidad y variedad de los productos finales dependen del tipo de sustrato (hexosa o pentosa) y del tipo de microorganismo, puesto que cada microorganismo tiene enzimas específicas. De acuerdo a las reacciones estequiométricas de la fermentación oscura, el máximo rendimiento teórico es de 4 mol de hidrógeno/mol de hexosa al generarse acetato como metabolito secundario; la formación de un mol de butirato, conduce a la producción de 2 moles de hidrógeno (Ec. 1 y 2). Los más altos rendimientos alcanzados han sido

asociados a la producción de la mezcla acetato y butirato (Ec. 3), y los más bajos han sido asociados a propionato y alcoholes (Hawkes et al. 2002). Sin embargo los rendimientos experimentales reportados son menores a los teóricos (Dávila et al. 2007).



#### 1.1.5. Inóculos

La fermentación oscura puede llevarse a cabo por medio de cultivos puros y mixtos. En los sistemas de cultivos puros, que únicamente contienen una clase de un microorganismo conocido, las rutas metabólicas se pueden detectar fácilmente y pueden revelar las mejores condiciones de operación que promuevan altos rendimientos y velocidades de producción de hidrógeno (Hafez et al. 2012). Por esta razón, los inóculos más usados en la fermentación oscura habían sido solamente puros. Sin embargo, al usar cultivos puros se tiene el inconveniente de que a nivel industrial la esterilización del sustrato usado, sería energéticamente desfavorable. Por otro lado, los cultivos mixtos constan de comunidades complejas de bacterias anaerobias que son generalmente originados de compostas, suelos, digestores anaerobios y aerobios, lo que les permite usar una gran variedad de desechos orgánicos complejos, no estériles y económicos, como sustrato (VanGinkel et al. 2001). El interés por usar estos inóculos surge debido a que en años recientes se obtuvieron rendimientos de producción de hidrógeno de ~2.45 mol de H<sub>2</sub>/mol de glucosa usando cultivos mixtos ricos en *Clostridium*. Además, estos procesos biológicos han demostrado ser más robustos y susceptibles a adaptarse con más facilidad cuando hay repentinos cambios en las condiciones ambientales (Guo et al.2010).

### 1.1.6. Pretratamiento del inóculo

El inóculo mixto obtenido de compostas y digestores anaerobios y aerobios, tiene una alta diversidad microbiana; además de tener bacterias productoras de hidrógeno como las fermentadoras y sintróficas, también contiene microorganismos que lo consumen como los metanógenos y las bacterias homoacetogénicas. La mayoría de los metanógenos son hidrogenotróficos que pueden reducir  $\text{CO}_2$  a metano, usando al  $\text{H}_2$  como donador primario de electrones provocando así disminución en los rendimientos de su producción (Liu et al. 2008). Se han aplicado diferentes estrategias para inhibir a estos últimos microorganismos, condiciones a las cuales, las bacterias productoras de hidrógeno, principalmente del género *Clostridium*, son resistentes debido a su habilidad para formar esporas (Baghchehsaraee et al. 2008). Una spora puede ser resistente al calor, a los químicos y a la radiación. Entre las estrategias de inhibición de metanogénesis está la adición de sustancias, como el cloroformo que bloquea e inhibe la función de las enzimas de los metanógenos (Hu et al. 2007), el iodopropano y el ácido 2-bromoetano sulfónico (Zinder et al. 1984). Existe además, la posibilidad de aplicar las condiciones ambientales adecuadas para suprimir a los metanógenos, como es el caso de los choques de pH (bajar el pH a condiciones a las cuales los metanógenos no puedan tolerar), tratamientos térmicos y altas tasas de dilución (lavado celular). El tratamiento térmico radica en aplicar temperaturas aproximadas de  $100\text{ }^\circ\text{C}$  por 45 min (Chang et al 2008). El lavado celular consiste en que, basándonos en las tasas de crecimiento microbiano, se pueden lavar a los metanógenos del reactor y conservar a los productores de hidrógeno. Se ha reportado que en metanógenos el tiempo de generación varía entre 15 y 85 horas (Ilyin et al. 2005), mientras que en las bacterias del género *Clostridium* son mucho menores, como en el caso de *C. perfringens* que es de 10 a 15 min (Dürre 2005). Asimismo, en otro estudio se desarrolló un modelo que mostró que usando un tiempo de retención de sólidos menor a 4.2 días, se pueden lavar del reactor a los metanógenos hidrogenotróficos, sin necesidad de aplicar cualquiera de los otros tipos de pretratamiento ya descritos (Hafez et al. 2011).

### 1.1.7. Reactores usados en la fermentación

El reactor EGSB (Expanded Granular Sludge Bed) es considerado una modificación del UASB (Upflow Anaerobic Sludge Bed). Ambos reactores se caracterizan por formar agregados microbianos densos, mediante autoinmovilización, denominados gránulos (Fuentes et al. 2011). Aunque una de las principales limitantes es la necesidad de invertir varios meses para la formación de éstos (Yu et al. 2006). En el UASB, las velocidades ascensionales ( $V_{up}$ ) aplicadas van de 0.5 a 2 m/h y en el EGSB las velocidades ascensionales son mucho más altas. Marin et al. (1999) han señalado que el EGSB debe tener una expansión del lecho de entre 20 y 40%. Liu et al. (2006) demostraron que al aplicar  $V_{up}$  mayores a 2 m/h el lecho comienza a expandirse y que para lograr una expansión de 20% deben aplicarse  $V_{up}$  mayores a 3 m/h para partículas de 1 a 2 mm, mientras que  $V_{up}$  mayores a 4 m/h cuando las partículas tienen diámetros entre 3 y 4 mm. Las altas velocidades ascensionales pueden lograrse gracias al sistema de recirculación y a la elevada relación altura-diámetro de los reactores EGSB (Seghezzi et al. 1998). La expansión generada permite más oportunidad de contacto entre el agua y los gránulos reduciendo el volumen muerto. Se puede separar el lodo disperso o floculento del gránulo maduro debido a que estos últimos presentan buenas características de sedimentación lo que permite una mejor retención celular. Como consecuencia la calidad del efluente en el tratamiento de aguas residuales es mucho mejor. Las aplicaciones de los reactores EGSB se han enfocado principalmente en el tratamiento de aguas residuales, debido a todas estas ventajas; sin embargo, a pesar de su poca aplicación en la producción de hidrógeno, han generado gran interés en este tema ya que al tratar aguas residuales con altas cargas orgánicas ( $>40$  kg DQO/m<sup>3</sup>/d) se puede llegar a producir grandes cantidades de gas (Seghezzi et al. 1998).

### 1.1.8. Proceso de la granulaci3n microbiana

La granulaci3n es un proceso en el que la biomasa suspendida tiende a unirse para formar gr3nulos bien definidos y estructurados (Hulshoff Pol et al. 2004). Es un proceso muy complejo que implica la participaci3n de diferentes grupos tr3ficos bacterianos y sus interacciones fisicoqu3micas y microbiol3gicas. La diversidad microbiana de estas estructuras las hace capaces de degradar afluentes complejos y a lo largo del tiempo se han ido desarrollando distintos modelos y teor3as sobre el desarrollo de los agregados microbianos, como se menciona a continuaci3n.

#### 1.1.8.1. Modelo termodin3mico sobre la formaci3n de gr3nulos.

En base a la arquitectura de la envoltura celular de las bacterias, 3stas pueden ser estructuralmente separadas en dos grupos, las Gram positivas y las Gram negativas. Ambas superficies presentan cargas negativas debido al 3cido lipoteicoico de las Gram positivas y a los lipopolisac3ridos de las Gram negativas presentes en sus paredes celulares, por lo que naturalmente tienden a repelerse. Sin embargo, cuando una c3lula est3 cerca de otra c3lula puede ocurrir una interacci3n inicial la cual se puede deber a distintos mecanismos: 1) por difusi3n, que es el resultado del movimiento browniano y permite interacciones al azar; 2) por movimiento activo, debido a un gradiente qu3mico quimiot3ctico; 3) por transporte advectivo a causa del movimiento del agua siendo 3ste mucho m3s r3pido que el difusivo y el activo y; 4) por el movimiento propio de las bacterias (Liu et al. 2002; Maier et al. 2009). Una vez que se ha logrado el contacto entre las c3lulas, sucede la adhesi3n. Seg3n la teor3a DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek), la adhesi3n es un proceso fisicoqu3mico controlado por un balance de fuerzas electrost3ticas (repulsivas), interacciones hidrof3bicas (atractivas) y fuerzas de Van der Waals (atractivas) (Hermansson 1999). La adhesi3n inicial sucede cuando las fuerzas atractivas superan las repulsivas y las c3lulas logran acercarse a una cierta distancia entre s3. Esta adhesi3n es d3bil, reversible y depende de fuerzas i3nicas, dipolos, puentes de hidr3geno e interacciones

hidrofóbicas. Posteriormente la célula puede lograr una adhesión irreversible gracias a las características específicas de las bacterias como sus apéndices. Los apéndices celulares incluye a los pili y las fimbrias, los cuales al tener varios grupos funcionales como los hidrofóbicos o sitios de carga positiva, permiten que la adhesión suceda (Maier et al. 2009, Van Loosdrecht et al. 1990). Finalmente, el gránulo va a madurar por la proliferación celular.

#### 1.1.8.2. Modelo de microcolonia sintrófico.

A pesar de la robustez del modelo anterior, es claro que las bacterias no están ni cerca de ser químicos inertes o partículas ideales, no presentan superficies con geometrías simples o definidas, ni una composición uniforme (Darnell et al. 1986). Es por eso que es importante tener en cuenta los aspectos biológicos y ecológicos de los microorganismos al desarrollar un modelo de granulación. Es bien sabido que existen varios tipos de bacterias presentes en los gránulos bacterianos que están implicados en los procesos de biodegradación. Toda esta diversidad microbiana se desarrolla en una relación sintrófica muy estrecha, donde los productos se transfieren de manera eficiente entre las correspondientes comunidades de bacterias (Thiele et al 1988). El modelo de microcolonia sintrófico indica que para que esta relación de sinergia se lleve a cabo las bacterias tienden a formar microcolonias estables o consorcios (Hirsch 1984).

#### 1.1.8.3. Sustancias poliméricas extracelulares

En el modelo termodinámico se hizo mención sobre la adhesión microbiana que involucra la participación de sustancias poliméricas extracelulares (SPE). Las SPE son polímeros orgánicos de origen microbiano responsables de la unión entre las mismas células (cohesión) y con el sustrato (adhesión) (Characklis 1989). También son conocidas como exopolisacáridos, polisacáridos extracelulares y exopolímeros. Las SPE proveen el esqueleto dentro del cual son insertadas las células. Su composición química se basa en polisacáridos (monosacáridos, ácidos urónicos y aminoazúcares), proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y sustancias



húmicas (Wingender et al. 1999). Los polisacáridos habían sido considerados como los constituyentes más abundantes de las SPE, sin embargo, su composición es influida por la disponibilidad de nutrientes, el tipo de microorganismo y las condiciones ambientales. Por ejemplo, se ha visto que en lodos metanogénicos predominan las proteínas y en los acidogénicos los carbohidratos. Las SPE funcionan creando una matriz gelatinosa que permite fijar a los microorganismos, y además actúa como una especie de resina de intercambio iónico para filtrar los nutrientes esenciales. Las SPE al crear esta matriz proporcionan estabilidad mecánica debido a los enlaces de las moléculas implicadas (Davies et al. 2000), y se ha mencionado que crea un microambiente que protege a las células en las situaciones de estrés como los cambios en el pH y temperatura. Las SPE representan un elemento importante en la formación de consorcios estables (Allison et al 2000) ya que la distancia de difusión para los intermediarios es minimizada, por lo que es una manera muy eficiente de conservar cada fracción de energía disponible (Hulshoff Pol 1989). Sin embargo, aún no es claro si la adhesión irreversible entre célula-célula se da antes de la producción de SPE por los apéndices bacterianos o gracias a la producción de estos exopolímeros. Una vez que comenzó el proceso de granulación, el gránulo continuará creciendo y madurando por la proliferación celular y la producción de SPE, y su forma y tamaño quedará determinada por la hidrodinámica, las especies microbianas y el tipo y concentración de sustrato.

#### 1.1.8.4. Teoría de la presión de selección

La teoría de la presión de selección señala que la granulación se basa en la selección de partículas en el reactor. El lodo disperso y ligero se lavará mientras los componentes más pesados se mantendrán dentro del reactor. Esta selección está gobernada por la velocidad de producción del gas y la velocidad de carga hidráulica. La velocidad de carga del lodo (Kg DQO/g SSV/d) determina la velocidad de crecimiento y es un prerequisite para el desarrollo del lodo granular. También es reconocido que una mayor velocidad de carga de lodo incrementa la

producción de gas y tiene un papel importante en el proceso de lavado celular. Así mismo, una apropiada velocidad de carga hidráulica es necesaria para la retención selectiva de la fracción del lodo más pesada (Hulshoff Pol et al. 1983).

#### 1.1.8.5. Gránulos productores de hidrógeno

La granulación metanogénica ha sido ampliamente estudiada y no fue hasta el año 2002 que se observó por primera vez el fenómeno de granulación hidrogenogénica (Fang et al. 2002). Los gránulos productores de hidrógeno exhiben ciertas diferencias de los metanogénicos y se cree que los primeros tienen un mecanismo de formación distinto al de los segundos (Liang et al. 2010). Esto es porque además de las teorías sobre la granulación ya mencionadas, se cree que en especial para los gránulos metanogénicos, la granulación podría ser iniciada o bien, por la adhesión a precursores inertes como el  $\text{Ca}^{2+}$  que sirven como núcleos para crecimiento microbiano (Yu et al. 2001), mecanismo improbable en la formación de gránulos productores de hidrógeno porque sus análisis han revelado bajo contenido de cenizas (Mu et al. 2006); o por los metanógenos filamentosos, microorganismos que no están presentes en los gránulos productores de hidrógeno, y quienes debido a las condiciones hidrodinámicas del reactor y por enrollamiento, forman conglomerados a los que posteriormente se unirán acetógenos, acidógenos e hidrogenótrofos provocando la maduración del gránulo (Ahn et al. 2000). Los gránulos productores de hidrógeno son generalmente de color crema, estructura porosa y presentan una comunidad bacteriana muy simple y, en comparación con los gránulos metanogénicos, tienen un mayor contenido de SPE. En cuanto a la relación proteína/carbohidrato (P/C) de los gránulos productores de hidrógeno se ha visto que va desde 0.2 hasta 0.6 (Fang et al. 2002, Mu et al. 2006, Zhang et al. 2008); en cambio para los metanogénicos, se han reportado entre 2 y 6 (Schmidt y Ahring, 1996). Los diámetros de los gránulos productores de hidrógeno han sido muy variados desde 0.4 hasta 4 mm y tienen muy buenas capacidades de sedimentación con valores entre 21 y 83.52 m/h (Mu et al. 2006, Liang et al. 2010, Zhang et al. 2008). En

cuanto a las condiciones adecuadas para llevarse a cabo el proceso de granulación, se han realizado varios estudios sobre el papel que tiene la hidrodinámica en la granulación aerobia, la anaerobia y en las biopelículas (Vieira et al. 1993, Tay et al. 2001, Noyola et al. 1994), y en todos los casos se observó que al aumentar la fuerza de corte hubo mayor producción de SPE. En estos estudios la fuerza de corte estuvo determinada por la velocidad del flujo de aire y del líquido. Sin embargo, hasta el momento no se ha determinado el papel que juega la hidrodinámica, específicamente la velocidad ascensional del líquido, en la formación de gránulos hidrogenogénicos y sus características en reactores EGSB.

## 1.2. JUSTIFICACIÓN

Durante las últimas décadas la producción biológica de hidrógeno ha sido un tema importante de investigación, debido a la problemática actual generada por los combustibles fósiles. A pesar de esto, aún no se ha podido desarrollar la tecnología de producción de manera que se pueda aplicar industrialmente. Los estudios más recientes se han enfocado en la producción en continuo de hidrógeno debido a razones prácticas y de eficiencia, para esto se han utilizado diferentes configuraciones de reactores como los CSTR y los de lecho fluidificado. Existe otro tipo de reactores como el EGSB con escasas aplicaciones en la producción de hidrógeno. La ventaja del reactor EGSB de tener buena capacidad de retención celular en forma de gránulos, le permite soportar grandes cargas orgánicas estimulando mayor producción de gas, además le da cierta estabilidad al reactor y elimina la necesidad del uso de sedimentadores secundarios. No obstante, hasta la fecha existe el inconveniente de la necesidad de invertir demasiado tiempo en la formación de gránulos maduros. Debido a esto, es importante evaluar el efecto que tienen las condiciones hidrodinámicas en los reactores EGSB para formar gránulos hidrogenogénicos. Considerando lo anterior, en el presente estudio se determinará cómo la velocidad ascensional afectará la formación de gránulos productores de hidrógeno. Para el enriquecimiento de la biomasa productora de hidrógeno se han usado diferentes estrategias. En este caso se ha decidido trabajar con dos estrategias para eliminar a los metanógenos: 1) tratamiento térmico de lodo anaerobio y 2) cultivo de biomasa en un reactor CSTR aplicando altas tasas de dilución. El objetivo de usar la segunda estrategia para prevenir metanogénesis es permitir el desarrollo de un mayor número de especies microbianas, no solo aquellas capaces de esporular (especies obtenidas aplicando tratamiento térmico), sino también aquellas que además de producir hidrógeno sean capaces de contribuir a la secreción de sustancias poliméricas extracelulares que den estabilidad al gránulo.

### 1.3. HIPOTESIS

Distintas velocidades ascensionales en reactores EGSB inoculados con lodo anaerobio pretratado (térmicamente y por lavado celular), permitirán el desarrollo de biomasa granular hidrogenogénica con distintas características de sedimentación y potenciales de producción de hidrógeno.

### 1.4. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la hidrodinámica sobre la formación de gránulos hidrogenogénicos en reactores EGSB, inoculados con biomasa pretratada.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto que tiene un inoculo sometido a tratamiento térmico y uno sometido a altas tasas de dilución en un CSTR, en la formación de biomasa granular y en la producción de hidrógeno en reactores EGSB.
- Evaluar el efecto de la velocidad ascensional sobre la formación de biomasa granular y la producción de hidrógeno en dos reactores EGSB operados a velocidades ascensionales diferentes, utilizando el pretratamiento que haya logrado las mejores condiciones de granulación y producción de hidrógeno.
- Caracterizar la biomasa granular formada física, química y biológicamente.

## Capítulo 2. Materiales y métodos

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1. Inóculo

El lodo granular provino de un reactor UASB de la planta de tratamiento de agua residual de confitería de la empresa Ricolino, S.A de C.V. ubicada en San Luis Potosí, S.L.P., México.

#### 2.1.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo para los reactores EGSB, CSTR y para las actividades hidrogenogénicas en lote consistió (g/L): glucosa (10) como fuente de carbono,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (11.867), extracto de levadura (0.2),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (4.5),  $\text{ZnCl}_2$  (0.075),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.125),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.1),  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.00125),  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.11),  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.091) y  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.0077).

#### 2.1.3. Reactores

Los reactores EGSB de acrílico eran de 4 cm de diámetro interno y 96 cm de altura. El volumen total fue 1.206 L y el de trabajo de 1.12 L. El reactor CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor) de vidrio, con un volumen total de 3 L y con un volumen de trabajo de 2 L, estuvo equipado con un sistema controlador y software de adquisición de datos Xpert 1.3 (Applikon Biotechnology).

### 2.2. Metodología

Primeramente se determinó el efecto del pretratamiento del inóculo en la formación de gránulos hidrogenogénicos. Para esto se pusieron en marcha dos reactores EGSB1 y EGSB2 con las mismas condiciones de tiempo de residencia

hidráulico (TRH), velocidad de carga orgánica (VCO), temperatura y pH. Cada uno fue inoculado con biomasa sometida a un distinto tratamiento para eliminar la metanogénesis: térmico y lavado celular en un CSTR. Después de analizar los resultados obtenidos, se seleccionó el pretratamiento con el que se obtuvieron gránulos con mejores características de sedimentación y producción de hidrógeno, para posteriormente inocular otros dos reactores, EGSB3 y EGSB4, que fueron operados a dos diferentes velocidades ascensionales, más altas a las aplicadas a los reactores EGSB1 o EGSB2.

### 2.2.1. Estrategias de eliminación de metanogénesis

Para eliminar a los microorganismos metanógenos se usaron dos diferentes pretratamientos del inóculo.

#### 2.2.1.1. Tratamiento térmico

El inóculo se sometió a un secado a 100°C por una hora. La biomasa obtenida de este tratamiento se usó para inocular los reactores EGSB1, EGSB3 y EGSB4 y para la determinación de la actividad hidrogenogénica específica.

#### 2.2.1.2. Lavado celular

Se usó el reactor CSTR (sección 2.1.3.) que se inoculó con una concentración de 9 g SSV/L. Se alimentó a una carga de 32 g DQO/L/d por 12 días y después a una carga de 63.6 g DQO/L/d por 20 días a una temperatura de 25°C y una agitación de 150 rpm. El pH se mantuvo cercano a 5.5 que es el óptimo reportado para la producción de hidrógeno (Perna et al. 2011). Se operó con un TRH de 8 h para seleccionar la mayor cantidad de especies microbianas y, al mismo tiempo, lavar a los metanógenos ya que se ha visto que su tiempo de generación es entre 15 y 85 horas (Ilyin et al. 2005), mientras que para los productores de hidrógeno del género *Clostridium* es mucho menor. La biomasa se comenzó a cosechar a partir de que no hubo producción de metano, que en este caso fue en el día 4. Se

analizaron diariamente muestras para determinar la composición del gas y se recolectaron muestras diarias para cuantificación de sólidos suspendidos volátiles. Se guardó biomasa a 4 °C para la posterior cuantificación de la actividad hidrogenogénica específica.

### 2.2.2. Condiciones de operación de los reactores EGSB

Los reactores EGSB se inocularon con una concentración de 9 g SSV/L. Se operaron con un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 10 h, con un flujo de alimentación de 1.87 mL/min, pH de 5.5 y una temperatura de 25°C por 24 días. Fueron alimentados a una carga orgánica constante de 25.6 g DQO/L/d. Para los reactores EGSB1 y EGSB2 se aplicó una  $V_{up}$  de 2.5 m/h y para los reactores EGSB3 y EGSB4 se aplicó una  $V_{up}$  de 3.5 y 4.5 m/h, respectivamente. Una de las características principales del EGSB es la expansión del lecho (entre 20 y 40 %), para lograr este porcentaje de expansión se debe tener en cuenta el tamaño de la partícula. Para gránulos de 1 a 2 mm de diámetro se debe aplicar una  $V_{up}$  entre 3 y 7 m/h (Liu et al. 2006). Como nuestra biomasa al inicio tenía un tamaño de 250  $\mu$ m se decidió usar en el primer experimento una velocidad de 2.5 m/h (EGSB1 y EGSB2), que es un poco menor a la de 3 m/h. Así mismo, en los experimentos posteriores, se decidió usar  $V_{up}$  de 3.5 m/h (EGSB3) y 4.5 m/h (EGSB4) para ver el efecto que tienen estas velocidades en el inicio de la granulación. Además, las tres  $V_{up}$  permitieron una buena expansión de la biomasa y mejor contacto del efluente con los microorganismos. Las velocidades ascensionales se obtuvieron con la suma de la velocidad de recirculación, más la velocidad del flujo de la alimentación (0.09m/h) (Tabla 1, Ec. 4).

$$Q_r = V_{upr} * A \quad (4)$$

Donde  $Q_r$  es el flujo de recirculación en mL/min,  $V_{upr}$  es la velocidad ascensional de la recirculación en m/h, A es el área de la sección transversal del reactor 12.56 cm<sup>2</sup>.



El seguimiento de los reactores se realizó mediante el análisis diario de la composición del biogás (Dávila et al. 2008). Así mismo se tomaron muestras diarias del efluente para determinar concentración de formiato, acetato, propionato, lactato y butirato (ácidos grasos volátiles, AGVs), glucosa residual y sólidos suspendidos volátiles (SSV). Al final de la operación de los reactores se determinó el contenido de sólidos volátiles y se caracterizó física, química y biológicamente la biomasa granular obtenida, determinando su actividad hidrogenogénica específica.

**Tabla 1.** Velocidades ascensionales ( $V_{up}$ ) de los 4 reactores EGSB con sus respectivos flujos de recirculación ( $Q_r$ ).

Reactor	Pretratamiento	$V_{upt}^a$ (m/h)	$V_{upr}^b$ (m/h)	$V_{upa}^c$ (m/h)	$Q_r^d$ (ml/min)
<b>EGSB1</b>	Térmico	2.5	2.41	0.09	50.4
<b>EGSB2</b>	Lavado celular	2.5	2.41	0.09	50.4
<b>EGSB3</b>	Térmico	3.5	3.41	0.09	71.4
<b>EGSB4</b>	Térmico	4.5	4.41	0.09	92.3

<sup>a</sup> $V_{upt}$  Velocidad ascensional total

<sup>b</sup> $V_{upr}$  Velocidad ascensional de la recirculación

<sup>c</sup> $V_{upa}$  Velocidad ascensional de la alimentación

<sup>d</sup> $Q_r$  Flujo de la recirculación

### 2.2.3. Métodos analíticos

#### 2.2.3.1. Producción y composición del gas

El volumen de gas producido por los reactores se midió con un dispositivo que se basa en el método de desplazamiento de agua. La producción de gas en los experimentos en lote se midió con el método de la bureta graduada invertida. La

composición del gas se determinó por cromatografía de gases. El equipo usado fue un cromatógrafo GC, 6890N Network GC System, Agilent Technologies, (Waldbronn, Germany) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) y una columna Hayesep D (Altech, Illinois, USA) con las dimensiones 10'x 1/8" x 0.085". Las temperaturas del puerto de inyección, horno y detector fueron 250, 60 y 250 °C, respectivamente. El gas acarreador fue nitrógeno a un flujo de 8 mL/min. Se realizó una curva de calibración con gases estándar de alta pureza.

#### 2.2.3.2. Determinación de ácidos grasos volátiles

La concentración de formiato, acetato, propionato, lactato y butirato se determinó con un equipo de electroforesis capilar Agilent 1600A con una columna capilar de sílica fundida (longitud efectiva=72 cm, id=50 µm y L=80.5 cm). La temperatura y el voltaje fueron de 20 °C y 30 kV, respectivamente. El buffer consistió en una solución de aniones básico (Agilent, pH= 12.1). Las muestras fueron congeladas hasta su uso. Posteriormente se descongelaron, se diluyeron, se centrifugaron a una velocidad de 13300 rpm y se filtraron con una membrana de 0.22 µm para evitar la presencia de células bacterianas. Las muestras se inyectaron a una presión de 300 mbar por 6 s y la detección indirecta UV fue usando un detector de arreglo de diodos. Para su cuantificación se realizó una curva con estándares de alta pureza (Dávila et al. 2008).

#### 2.2.3.3. Determinación de sólidos totales y suspendidos volátiles

Se determinaron de acuerdo a los Métodos Estándar (APHA 1998).

#### 2.2.3.4. Determinación de carbohidratos totales

Los carbohidratos totales se cuantificaron por el método de fenol-ácido sulfúrico de Dubois et al. (1956), el cual es un método colorimétrico que se basa en la reacción de los carbohidratos con el fenol en presencia de un ácido fuerte. La reacción produce un color amarillo-naranja y se lee espectrofotométricamente a 490 nm.

#### 2.2.3.5. Caracterización de la biomasa granular

Se evaluaron las características físicas, tales como color, velocidad de sedimentación, densidad, morfologías presentes, diámetro y granulometría; químicas, como el contenido de las sustancias poliméricas extracelulares (relación proteínas/carbohidratos); biológicas, mediante la actividad hidrogenogénica específica en experimentos en lote de la biomasa granular.

##### 2.2.3.5.1. Características físicas y químicas

###### 2.2.3.5.1.1. Morfología

Para visualizar las estructuras microbianas de los gránulos se usó un microscopio electrónico de barrido Philips-XL-30-SFEG. La microscopía electrónica de barrido es una técnica que permite estudiar la morfología de los gránulos ya que produce directamente una imagen de la estructura tridimensional de su superficie y tiene un poder de resolución de 10 nm. Se basa en el uso de electrones que son dispersados o emitidos desde la superficie del espécimen, que en este caso es el gránulo microbiano. Para ésto, el gránulo debe ser fijado, secado y posteriormente recubierto con una capa de metal pesado. El gránulo preparado es barrido con un haz estrecho de electrones. La cantidad de electrones emitidos por el gránulo es medida y usada para controlar la intensidad del segundo barrido, que se mueve en sincronía con el primero y así forma una imagen de la superficie (Alberts et al. 2002). La preparación de las muestras se realizó de acuerdo a Tay et al. (2001b), los gránulos se lavaron con PBS (phosphate buffered saline) 1X y se dejaron sedimentar. Posteriormente se fijaron en una solución de formaldehído al 4% diluido con PBS y se dejaron reposar por 4 horas a 4°C. Después se deshidrataron en soluciones de etanol al 40, 60, 80 y 100% diluidas con PBS por 10 minutos en cada una y por último se dejaron secar a temperatura ambiente.

#### 2.2.3.5.1.2. Diámetro y granulometría

El diámetro del gránulo se observó con un microscopio biológico triocular BA410 Marca Motic, las imágenes fueron tomadas con una cámara de 2 MP MoticCam2 y los diámetros fueron medidos usando un Software Motic Images Plus 2.0ML para PC. La muestra de biomasa se colocó en un portaobjetos para su medición y se tomaron fotografías de aproximadamente 100 campos de toda la muestra. Después se contaron y se calculó el porcentaje de los distintos tamaños de los gránulos obtenidos.

#### 2.2.3.5.1.3. Velocidad de sedimentación

Primero se calculó el número de Reynolds del reactor (Ec.5) para saber qué régimen de flujo se trabajaba:

$$Re = \frac{\rho d v_s}{\mu} \quad (5)$$

Donde: Re es el número de Reynolds adimensional,  $v_s$  es la velocidad de flujo (m/s), d es el diámetro del reactor (m),  $\rho$  es la densidad del agua ( $\text{kg/m}^3$ ) que es igual a  $997 \text{ kg/m}^3$ ,  $\mu$  es la viscosidad dinámica del agua ( $\text{N}\cdot\text{s/m}^2$ ) que es igual a  $0.890 \times 10^{-3} \text{ N}\cdot\text{s/m}^2$  ambas a  $25^\circ\text{C}$ .

Una vez obtenido el Re, se calculó el coeficiente ( $C_d$ ) de arrastre que depende del tipo de flujo obtenido. Para un Re menor a 1, se usa la Ec. 6 y para un Re entre 1 y 10,000 se usa la Ec. 7:

$$C_d = \frac{24}{Re} \quad \text{para } Re \leq 1 \text{ (Laminar)} \quad (6)$$

$$C_d = \frac{24}{Re} + \frac{3}{\sqrt{Re}} + 0.34 \quad \text{para } 1 < Re < 10000 \text{ (Transición)} \quad (7)$$

Las propiedades de sedimentación se determinan con el índice volumétrico del lodo, pero este método no se puede aplicar a biomasa granular debido a que sus altas velocidades de sedimentación hacen esta medición imprecisa (Hulshoff, 1989). Por ello, la velocidad de sedimentación se midió registrando el tiempo que tardaba un gránulo en caer desde una altura de 12.5 cm en una probeta de 50 mL que contenía agua destilada (modificado de Li et al. 2010). Una muestra de 5 mL de gránulos se tamizó a través de mallas de 1000, 850, 500 y 250  $\mu\text{m}$ . Se recuperaron 20 gránulos de cada malla y a cada uno se le determinó la velocidad de sedimentación. Una vez calculada la velocidad de sedimentación se calcularon las densidades de los gránulos dependiendo del régimen del flujo que existió en el reactor. La densidad de la partícula o gránulo se calculó de acuerdo a la ley de Stokes (Ec. 8) si el flujo correspondía al flujo laminar o de acuerdo a la ley de Newton (Ec. 9) si correspondía al flujo de transición (Crittenden et al 2005):

$$v_s = \frac{g(\rho_p - \rho)d_p^2}{18\mu} \quad (\text{Ley de Stokes}) \quad (8)$$

$$v_s^2 = \frac{4g(\rho_p - \rho)d_p}{3C_d \rho} \quad (\text{Ley de Newton}) \quad (9)$$

Donde  $v_s$  es la velocidad de sedimentación (m/s),  $d_p$  es el diámetro de la partícula (m),  $\rho$  es la densidad del agua ( $\text{Kg}/\text{m}^3$ ),  $\mu$  es la viscosidad dinámica del agua  $\text{N}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ,  $g$  es la aceleración de la gravedad,  $\rho_p$  es la densidad de la partícula y  $C_d$  es el coeficiente de arrastre.

#### 2.2.3.5.1.4. Sustancias poliméricas extracelulares

##### 2.2.3.5.1.4.1. Extracción de sustancias poliméricas celulares

Se determinaron por medio del método de extracción descrito por Liu et al. (2002). En ese estudio los autores compararon varios métodos de extracción y el uso de formaldehído al 36.5% junto con NaOH 1N, resultó ser el más efectivo. Además, la

muestra no se contaminó con sustancias intracelulares. Para la extracción se centrifugaron 10 mL de biomasa granular a 10,000 rpm, después se resuspendió con agua destilada y se adicionó 0.06 ml de formaldehído al 36.5 % por 1 h a 4°C. Se adicionaron 4 mL de NaOH 1 N por 3 h a 4 °C, se centrifugó a 13,000 rpm por 20 min y el sobrenadante se filtró con una membrana de 0.2 µm. El filtrado se purificó con una membrana de diálisis de 3,500 Daltones a 4°C por 48 horas para remover residuos de la extracción.

#### 2.2.3.5.1.4.2. Análisis de proteínas y carbohidratos totales

Después de realizar la extracción de las SPE, al filtrado se le determinó la concentración de carbohidratos totales y proteínas. Los carbohidratos totales se cuantificaron por el método de fenol-ácido sulfúrico de Dubois et al. (1956). Las proteínas se determinaron por el método colorimétrico de Bradford (1976), el cual es un método sensible, barato y rápido e implica el enlace del colorante azul brillante de Coomassie G-250 con las proteínas y la reacción se lee espectrofotométricamente a 595 nm.

#### 2.2.3.5.2. Características biológicas

##### 2.2.3.5.2.1. Actividad hidrogenogénica

La actividad hidrogenogénica específica (AHE) se evaluó en cultivos en lote, en botellas serológicas de 120 mL con un volumen de trabajo de 80 mL y un espacio de cabeza de 40 mL. Se analizó la actividad hidrogenogénica de la biomasa obtenida al final de la operación de cada reactor y de los dos inóculos usados. Primero se inoculó con la respectiva biomasa a una concentración de 4.5 g SSV/L, después se añadió el medio de cultivo (sección 2.1.2). Se aforaron las botellas con agua destilada hasta el volumen de trabajo y se adicionaron HCl 10 N o NaOH 2M para ajustar el pH a 7.5. Las botellas se sellaron con tapones de caucho y sellos de aluminio. El espacio de cabeza se purgó con gas nitrógeno por 15 segundos

para mantener condiciones anaerobias, eliminando el exceso de gas para equilibrar la presión de la botella con la presión atmosférica. Se incubaron a una temperatura de 25°C y una velocidad de agitación de 150 rpm. Se midió el volumen de gas producido con un dispositivo de desplazamiento de líquido que consistió en una bureta graduada invertida. La composición del gas se analizó por cromatografía de gases. Cada experimento se realizó por triplicado y se determinó la producción acumulada de hidrógeno. Por último, se usó la ecuación de Gompertz (Ec. 10) para ajustar la cinética de producción de hidrógeno (Dávila et al. 2008).

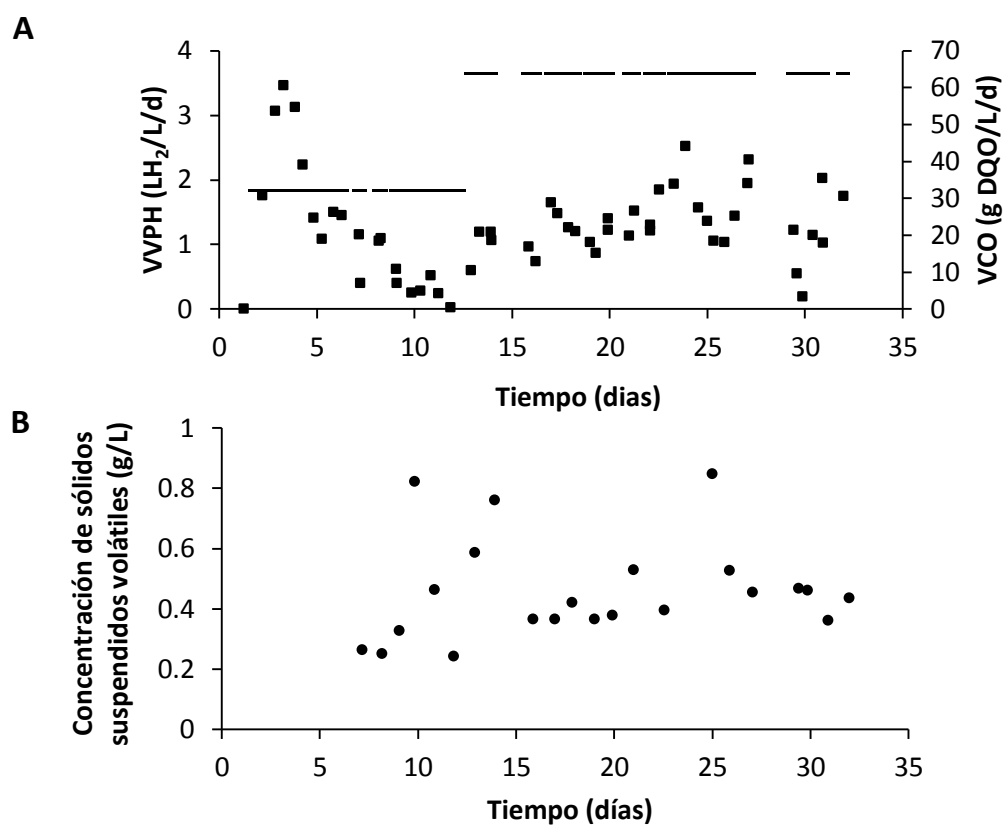
$$H(t) = H_{max} * exp \left\{ -exp \left[ \frac{2.71828 * R_{max}}{H_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (10)$$

Donde, H(t) es la cantidad total de hidrógeno producida en mL, en el tiempo (t) en h; H<sub>max</sub> es la máxima cantidad de hidrógeno producida en mL; R<sub>max</sub> es la máxima velocidad de producción de hidrógeno en mL/h y λ es la duración en horas de la fase de adaptación. Además se analizó la composición de la fase líquida por electroforesis capilar para determinar ácidos grasos volátiles presentes al final de las actividades.

## Capítulo 3. Resultados y discusión

### 3.1. Desempeño del reactor CSTR

El reactor CSTR se operó por 32 días. Durante su operación se observó una velocidad máxima de producción al inicio de 3.5 L H<sub>2</sub>/L/d, la cual posteriormente disminuyó. Se decidió entonces aumentar la carga a 63.6 g DQO/L/d en donde la producción se mantuvo entre 1 y 2.5 L H<sub>2</sub>/L/d (Fig. 2A).



**Figura 2.** A) Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno, VVPH (■) obtenida, durante el tiempo de operación del reactor CSTR y velocidad de carga orgánica aplicada, VCO (-); B) concentración de sólidos suspendidos volátiles en el efluente, SSV (●).



Se determinaron los sólidos suspendidos en el efluente para determinar el volumen de éste, necesario para cosechar la biomasa suficiente para inocular el reactor EGSB2 y las actividades hidrogenogénicas específica en lote. La concentración de sólidos en el efluente varió desde 0.2 hasta 0.8 g/L. (Fig. 2B). La producción de metano cesó en el día 4 y a partir de entonces se comenzó a cosechar la biomasa (no se muestran los datos).

### 3.2. Desempeño de los reactores EGSB

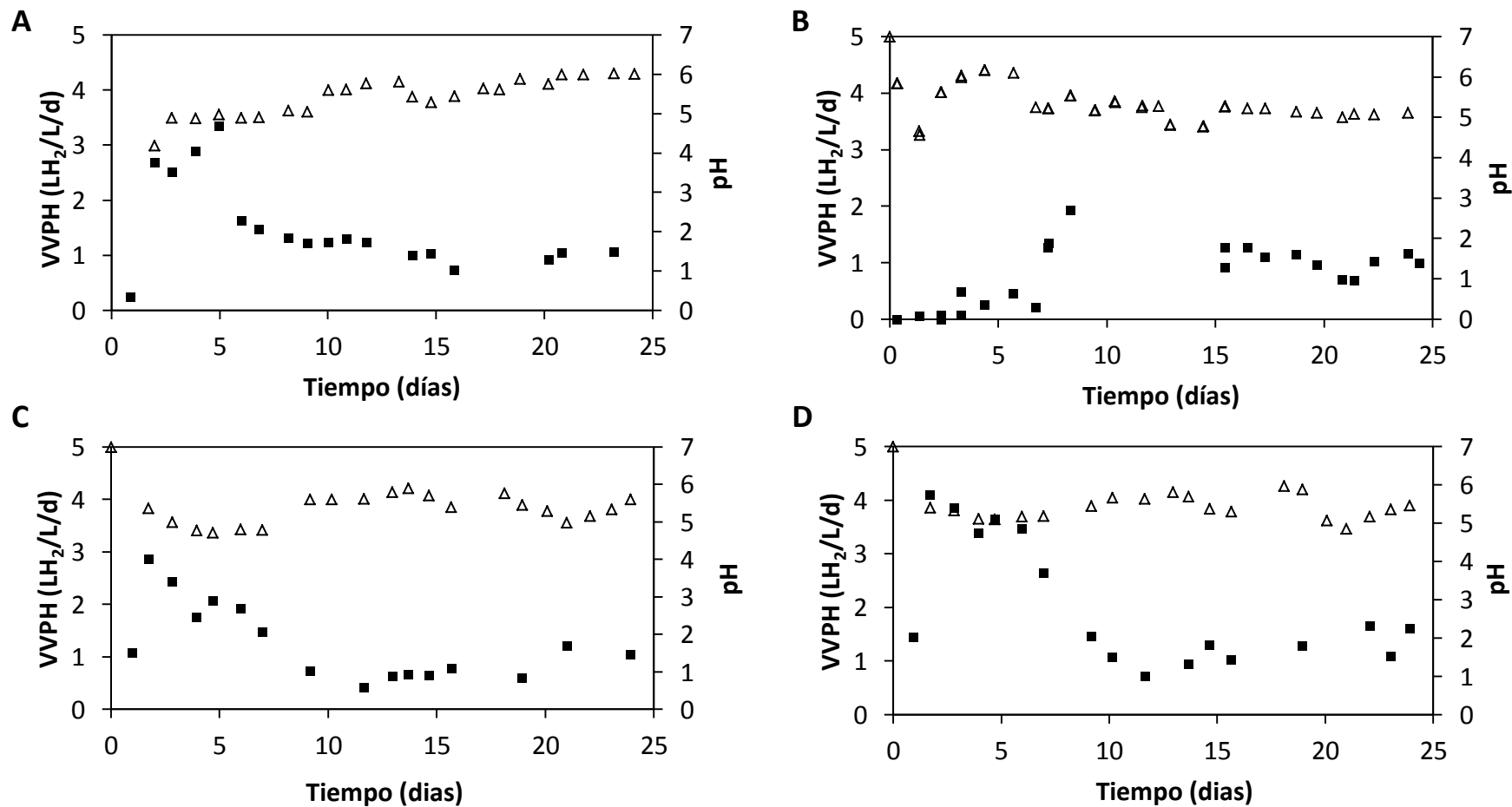
En la Fig. 3A se observa que la producción de hidrógeno en el EGSB1 comenzó inmediatamente entre los días 1 y 2, alcanzando la máxima velocidad de producción en el día 5 con 3.35 L H<sub>2</sub>/L/d. Después de ese día disminuyó hasta alcanzar una velocidad de producción promedio de 1.06 L H<sub>2</sub>/L/d. Cabe mencionar que el promedio del periodo estable de todos los EGSB se tomó en cuenta desde el día 10 aproximadamente hasta el final de su operación. Por otro lado, el reactor EGSB2 (Fig. 3B), que fue el reactor inoculado con biomasa obtenida del CSTR, se operó por la misma cantidad de días y se puede ver que el inicio de la producción de hidrógeno comenzó después que en el reactor EGSB1. Aunque la producción de hidrógeno en el EGSB2, se observó desde el día 4, esta producción fue muy pequeña debido a que, probablemente, las bacterias presentes se encontraban en un periodo de adaptación ya que el inóculo usado estuvo almacenado a 4 °C aproximadamente dos semanas. Después, en el día 6 alcanzó un máximo de 1.93 L H<sub>2</sub>/L/d valor casi 1.5 veces menor que el alcanzado por el reactor EGSB1. La producción durante el periodo estable se mantuvo con un valor cercano a 1.02 L H<sub>2</sub>/L/d, que es similar al alcanzado en el EGSB1. La Fig. 4A muestra la composición del gas del EGSB1, donde se observa que el porcentaje de hidrógeno se mantuvo entre 64% y 47% durante el periodo estable. La composición del hidrógeno en el reactor EGSB2 (Fig. 4B) se mantuvo más estable, alrededor del 63 %. Al finalizar los dos primeros experimentos, se eligió usar el tratamiento térmico para los inóculos de los reactores EGSB3 y EGSB4, debido a que aunque las velocidades volumétricas de producción de hidrógeno

fueron similares, la biomasa obtenida del reactor EGSB1 mostró tener mejores características de granulación y de actividad hidrogenogénica específica en lote, tal como se presentará y discutirá posteriormente (Sección 3.8.1).

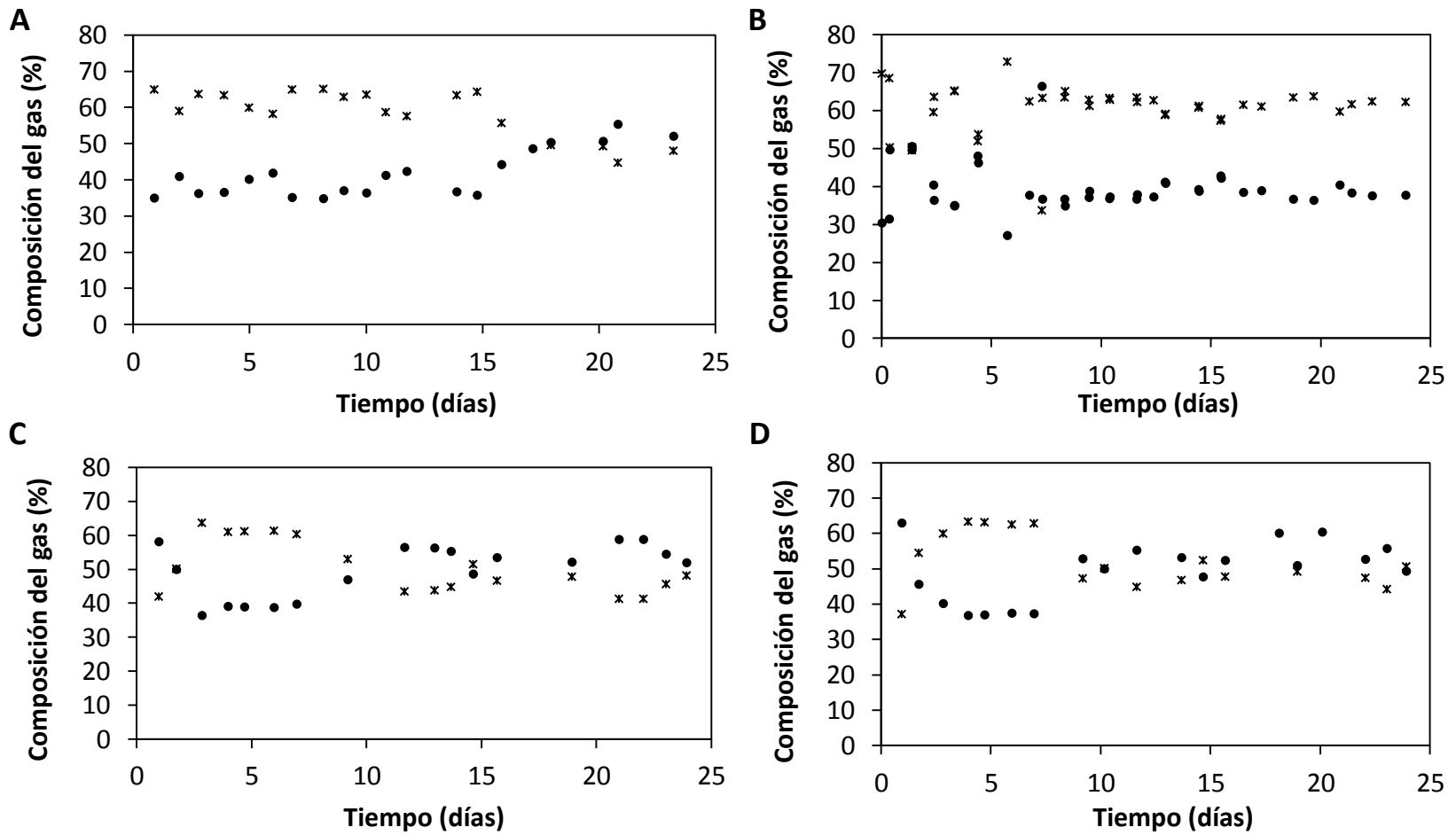
La velocidad volumétrica de producción de hidrógeno en el EGSB3 (Fig. 3C) tuvo un comportamiento similar al EGSB1 ya que en ambos inició inmediatamente la producción, solo que en el EGSB3 el valor máximo alcanzado fue de 2.86 L H<sub>2</sub>/L/d que coincidió con un incremento en el porcentaje de hidrógeno hasta 63% (Fig. 4C). Los siguientes días la VVPH se mantuvo estable en aproximadamente 0.83 L H<sub>2</sub>/L/d y el porcentaje de hidrógeno permaneció entre 41% y 57%. En el caso del reactor EGSB4 (Fig. 3D), que fue al que se le aplicó la  $V_{up}$  más alta (4.5 m/h), alcanzó la mayor velocidad volumétrica de producción de 4.1 L H<sub>2</sub>/L/d, manteniéndose posteriormente sin variación con un promedio de 1.19 L H<sub>2</sub>/L/d y el porcentaje de hidrógeno se mantuvo entre 45 y 53% (Fig. 4D).

En la Tabla 2 se resumen los valores promedio de VVPH alcanzados durante las fases estables de los 4 reactores EGSB usados en el presente estudio y su comparación con el realizado por Abreu et al. (2010). La VVPH promedio de todos los reactores en la etapa estable fue muy similar, aunque ligeramente mayor en el EGSB4. En cuanto a los resultados obtenidos por Abreu et al. (2010), usando una mezcla de biomasa enriquecida productora de hidrógeno junto con biomasa tratada térmicamente, los valores de VVPH obtenidos por los autores (~2 L H<sub>2</sub>/L/d) son ligeramente mayores que los obtenidos en nuestro trabajo, debido quizá por las distintas condiciones de operación y a la biomasa productora de hidrógeno enriquecida. Sin embargo cuando los autores usaron biomasa tratada térmicamente, obtuvieron velocidades de producción mucho menores, del orden de 0.1 L H<sub>2</sub>/L/d y los valores de rendimientos molares fueron muy similares en ambos estudios. En el EGSB1 (Fig. 3A) hubo dificultades para controlar el pH es por ello que se observó un ligero incremento de pH durante la operación que estuvo directamente relacionado con los valores de velocidad volumétrica de producción de hidrógeno, a mayor valor de pH se observó menor producción de hidrógeno. En el caso del EGSB2 (Fig. 3B), el pH al inicio era cerca de 6, cuando la producción de hidrógeno aun no comenzaba o era mínima; cuando comenzó

una mayor producción de gas se alcanzaron valores de pH entre 5 y 5.5, manteniéndose estables hasta el final. En el reactor EGSB3 el pH se mantuvo entre 5.5 y 6, y en el EGSB4 no varió significativamente lo que contribuyó a la estabilidad del comportamiento de este último reactor, ya que se ha señalado que el pH es un parámetro operacional importante en donde, un valor moderadamente ácido, entre 5 y 5.8, crea buenas condiciones para la producción de hidrógeno sin causar cambios drásticos en las condiciones ambientales para los productores de hidrógeno (Fang et al. 2002). No se observó producción de metano durante todo el periodo de operación de los 4 reactores EGSB, indicando que las dos estrategias usadas para eliminar metanógenos fueron efectivas.



**Figura 3.** Perfiles de velocidad volumétrica de producción de hidrógeno, VVPH (■) y de pH (Δ), durante la operación de los reactores EGSB1 (A), EGSB2 (B), EGSB3 (C) y EGSB4 (D).



**Figura 4.** Perfiles de composición de H<sub>2</sub> (\*) y CO<sub>2</sub> (•) en el gas producido a través del tiempo de operación de los reactores EGSB1 (A), EGSB2 (B), EGSB3 (C) y EGSB4 (D).

**Tabla 2.** Comparación de la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno y rendimientos molares usando reactores EGSB.

TRH <sup>a</sup>	VCO <sup>b</sup> g DQO/L/d	Sustrato	Pret. del inóculo	T <sup>c</sup> °C	Velocidad Ascensional m/h	VVPH <sup>d</sup> LH <sub>2</sub> /L/d	Rendimiento molar mol H <sub>2</sub> /mol de sustrato <sup>e</sup>	Referencia
6 h	20	Glucosa + arabinosa	Térmico + b.e. <sup>f</sup>	70	10	~2	1.3	Abreu et al. 2010
8 h	15	Glucosa + arabinosa	Térmico	70	10	0.1	0.37	Abreu et al. 2010
10 h	25.6	Glucosa	Térmico	25	2.5	1.06 (0.18)	0.38 (0.10)	Este estudio
10 h	25.6	Glucosa	Lavado celular	25	2.5	1.02 (0.20)	0.34 (0.07)	Este estudio
10 h	25.6	Glucosa	Térmico	25	3.5	0.83 (0.24)	0.28 (0.10)	Este estudio
10 h	25.6	Glucosa	Térmico	25	4.5	1.19 (0.30)	0.46 (0.13)	Este estudio

<sup>a</sup> Tiempo de Residencia Hidráulico

<sup>b</sup> Velocidad de Carga Orgánica

<sup>c</sup> Temperatura de operación

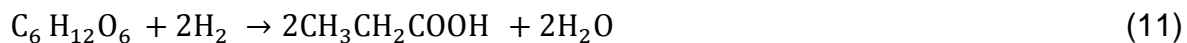
<sup>d</sup> Velocidad volumétrica de producción de hidrógeno promedio (desviación estandar)

<sup>e</sup> Rendimiento molar de hidrógeno promedio (desviación estandar)

<sup>f</sup> Biomasa enriquecida productora de hidrógeno

### 3.3. Composición de metabolitos de los reactores EGSB

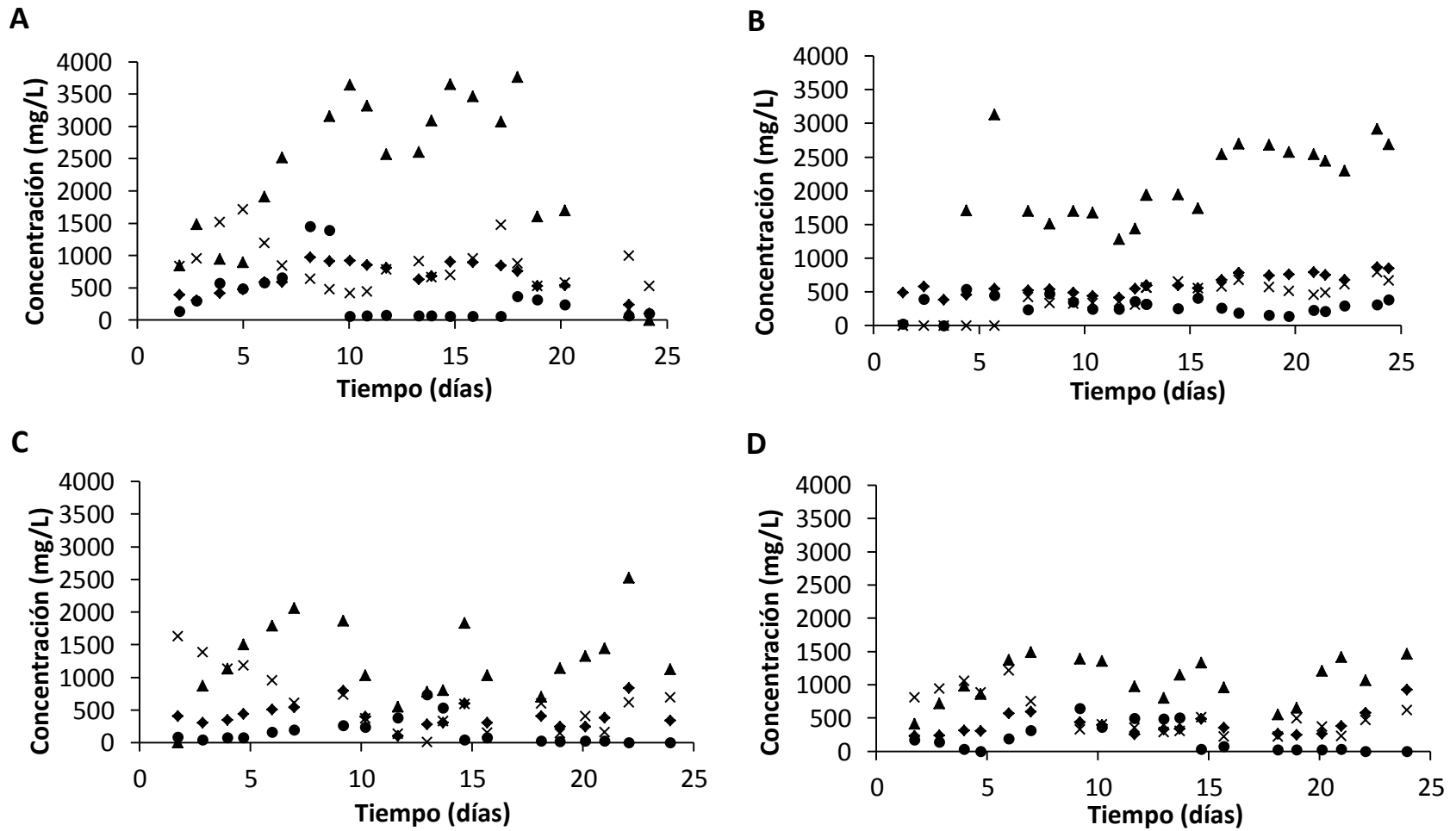
En la Fig. 5A se muestran los cambios en la distribución de ácidos grasos volátiles del EGSB1. Al inicio del experimento se observó al propionato como el principal metabolito, sin embargo, en el día 4 y 5, el butirato es el que predominó, siendo en estos dos días en los cuales se alcanzó la mayor velocidad volumétrica de producción de hidrógeno. Esto es porque se ha demostrado que altas concentraciones de ácido propiónico son desfavorables para la producción de hidrógeno (Ec. 11), mientras que la producción de ácido butírico la favorece (Antonopoulou et al. 2012). El acetato permaneció en una concentración de entre 500 y 1000 mg/L; el butirato varió de 500 a 1600 mg/L y lo hizo en relación a la concentración de propionato, si este último aumentaba, el primero disminuía. El formiato siempre fue el de menor concentración con valores entre 500 y 50 mg/L, excepto en los días 8 y 9. Cabe mencionar que el propionato alcanzó un valor máximo de 4,646 mg/L en el día 8, sin embargo, debido a la escala utilizada para fines comparativos no se muestra en la figura. En el reactor EGSB2, (Fig. 5B) en los primeros 3 días, se produjo una gran cantidad de propionato siendo los valores mayores de 6,271, 4,432 y 7,522 mg/L, datos que no se aprecian debido a las escalas. Estos valores correspondieron a los días en los que no hubo o hubo una mínima producción de hidrógeno; en el día 7 el propionato alcanzó un valor de 1,709 mg/L que se mantuvo aproximadamente estable hasta el final de la operación y, al igual que en el reactor EGSB1, fue el metabolito predominante. La producción de acetato, butirato y formiato estuvo en concentraciones menores a 500 mg/L y se mantuvieron estables durante todo el periodo de operación, lo que implica que la mayor parte del sustrato se usaba en la producción de propionato.



En los reactores EGSB3 y EGSB4 (Fig. 5C y D), las concentraciones de acetato y butirato se mantuvieron alrededor de ~500 mg/L y el formiato fue siempre el de menor concentración. En el EGSB3, se puede ver que la concentración de

propionato fue mayor entre los días 5 y 10 y tuvo un máximo en el día 22 por lo que también pudo contribuir a la baja VVPH promedio obtenida. Se observa claramente que la concentración de propionato del EGSB4 fue mucho menor que en los reactores EGSB1, EGSB2 y EGSB3, aunque siguió siendo el ácido predominante. Se ha reportado que la producción de propionato se debe a que este metabolito se produce cuando hay elevados niveles de hidrógeno, por lo que se presume que esta podría ser una de las razones de que este fue siempre el de mayor concentración (Agler et al. 2011). Otra posible razón podría ser que las condiciones de operación seleccionaron de manera predominante especies productoras de ácido propiónico ya que fue el principal metabolito y el único que tuvo cambios notables en su concentración en el EGSB4.





**Figura 5.** Concentraciones de ácidos grasos volátiles durante la operación de los reactores EGSB1 (A), EGSB2 (B), EGSB3 (C) y EGSB4 (D). Acetato (◆), propionato (▲), butirato (x) y formiato (●).

### 3.4. Eficiencia de consumo de glucosa y rendimiento molar

La eficiencia de consumo de glucosa en el EGSB1 al inicio fue de 88 % (Fig. 6A). Posteriormente aumenta en el día 10, aproximadamente hasta 98%, que coincidió con la presencia de gránulos pequeños, por lo que tal vez el aumento en la eficiencia de consumo se debió al incremento de biomasa. Las eficiencias de remoción de glucosa en el EGSB2 fueron mayores al inicio, aproximadamente de 95%, mientras que durante la etapa estable del reactor, fue de 80%. En los reactores EGSB1, EGSB3 y EGSB4, el consumo de glucosa entre los días 2 y 7 fue menor que el consumo durante el periodo estable, quizá porque hubo al inicio un lavado apreciable de biomasa tal como se observa en las Fig. 7B y 7C para los EGSB3 y EGSB4, respectivamente. Posteriormente la eficiencia de consumo aumentó hasta 99% en los 3 reactores, seguramente por la formación de pequeños gránulos, lo que indicó que el crecimiento microbiano había excedido el lavado celular y que efectivamente hubo una buena transferencia de masa usando las 3  $V_{up}$  diferentes.

El rendimiento molar de hidrógeno promedio de EGSB1 (Fig. 6A) fue de 0.38 mol  $H_2$ /mol<sub>glucosa</sub> y el del reactor EGSB2 (Fig. 6B) fue de 0.34 mol  $H_2$ /mol<sub>glucosa</sub>. El rendimiento molar promedio alcanzado en el EGSB3 fue de 0.28 mol  $H_2$ /mol<sub>glucosa</sub>, y en el EGSB4, de 0.46 mol  $H_2$ /mol<sub>glucosa</sub>. Comparando los rendimientos con los del estudio de Abreu et al. (2010), mostrados en la Tabla 2, se observa que son similares al que obtuvieron cuando usaron biomasa tratada térmicamente, pero alcanzaron rendimientos mayores al usar biomasa productora de hidrógeno enriquecida. Esto puede ser explicado por las distintas condiciones de operación, como el tipo de sustrato utilizado, la temperatura de 7'0° C y a la biomasa enriquecida. En cuanto a los rendimientos molares máximos alcanzados de 1.4, 1.17 y 1.78 en los reactores EGSB1, EGSB 3 y EGSB 4, respectivamente, fueron valores similares al alcanzado por Zheng y Yu (2005), de 1.75 mol  $H_2$ / mol<sub>glucosa</sub> usando sustrato a una concentración de 10 g/L, igual a la usada en este trabajo.

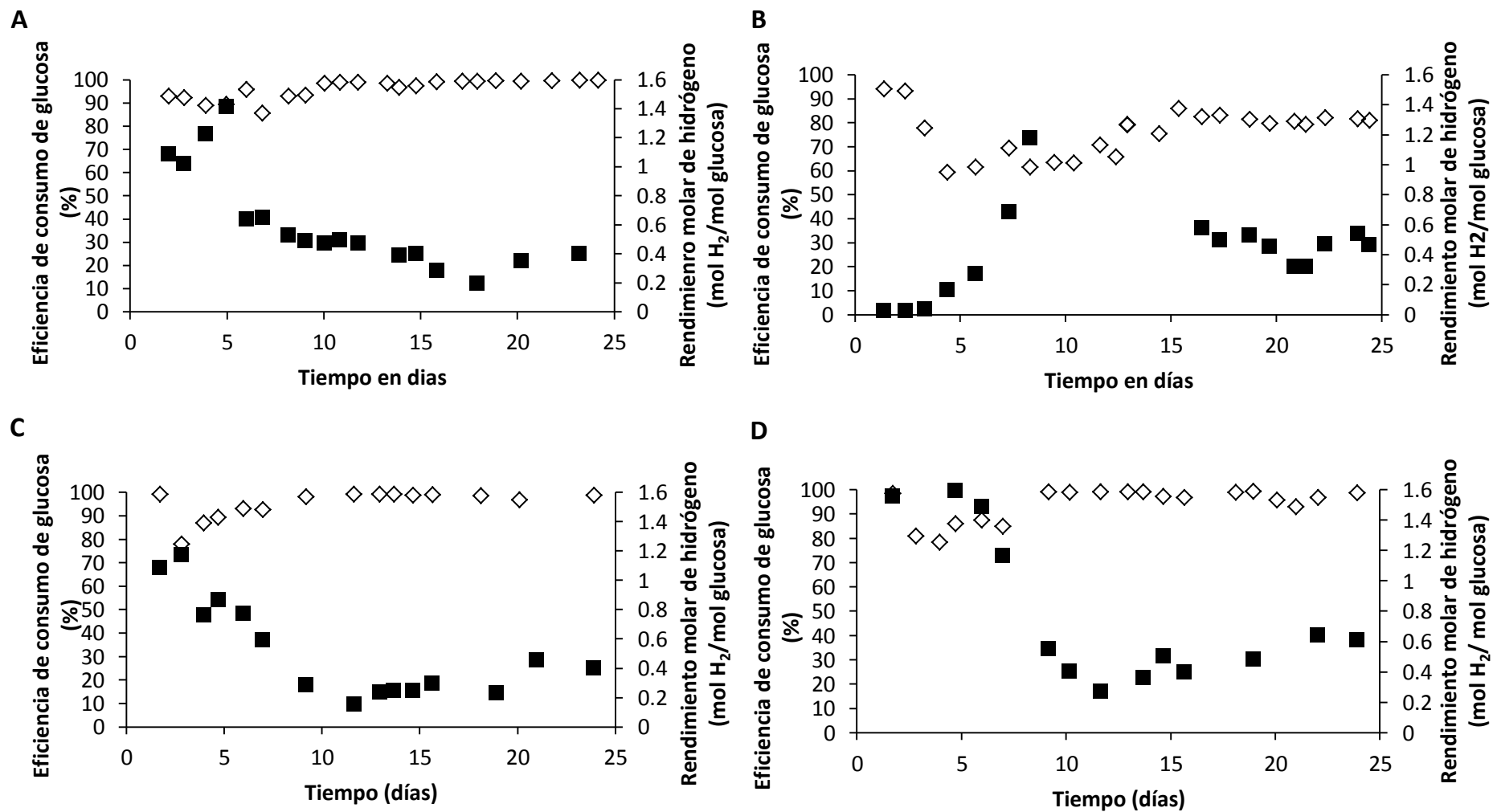
A pesar del aumento de las eficiencias de remoción de glucosa, no hay grandes diferencias ni en la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno ni en los

rendimientos molares, lo que implicaría que se seleccionó biomasa productora de propiónico, ya que se ha reportado que hay microorganismos que compiten por el sustrato y no producen hidrógeno, por lo que disminuyen los rendimientos molares (Jo et al. 2007).

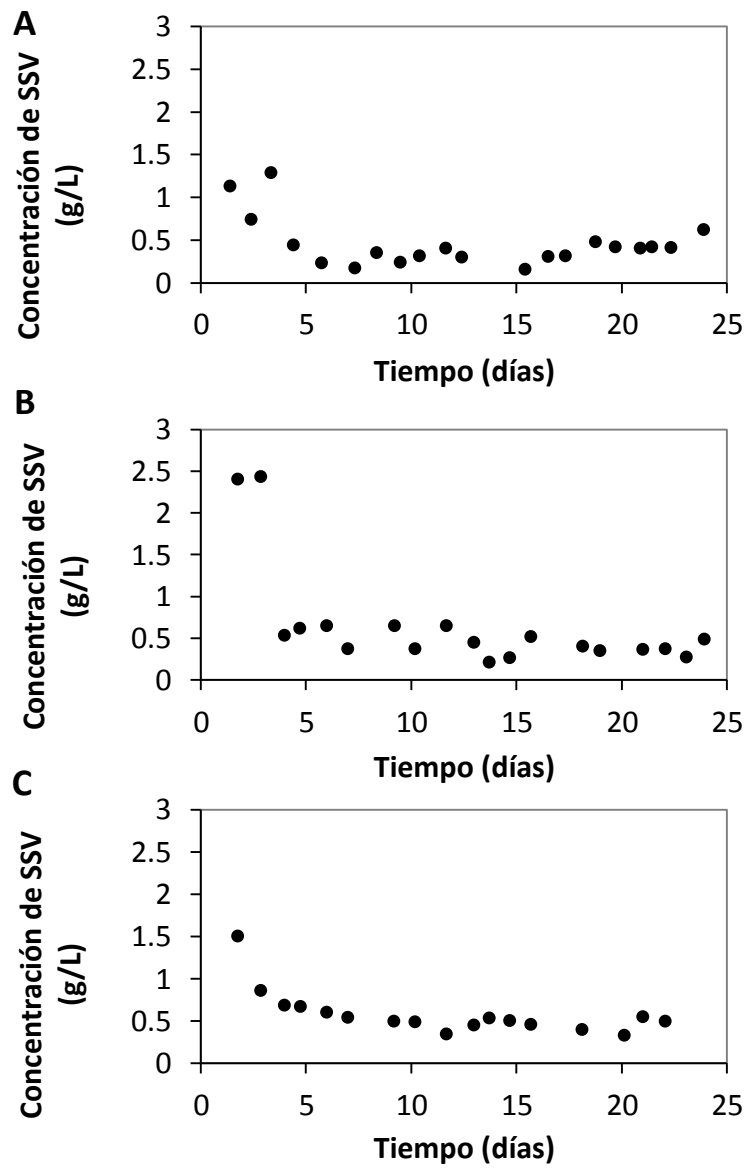
### 3.5. Balances de DQO

La Fig. 8 nos muestra los balances de DQO de los 4 reactores. Se observa como el consumo de glucosa en los reactores EGSB 1, 3 y 4 fue prácticamente el mismo. El EGSB2 fue el único reactor con menor consumo de glucosa y una fracción importante se fermentaba a propionato. Se puede ver que al usar la  $V_{up}$  de 3.5 y 4.5 m/h, en los reactores EGSB3 y EGSB4, la producción de ácidos grasos volátiles disminuyó, en especial el propionato, Así mismo, se observa un aumento en la cantidad de productos no determinados. Los productos no determinados pueden ser metabolitos distintos a los cuantificados, alcoholes (Hu et al 2007), e incluso mayor producción de biomasa y sustancias poliméricas extracelulares.

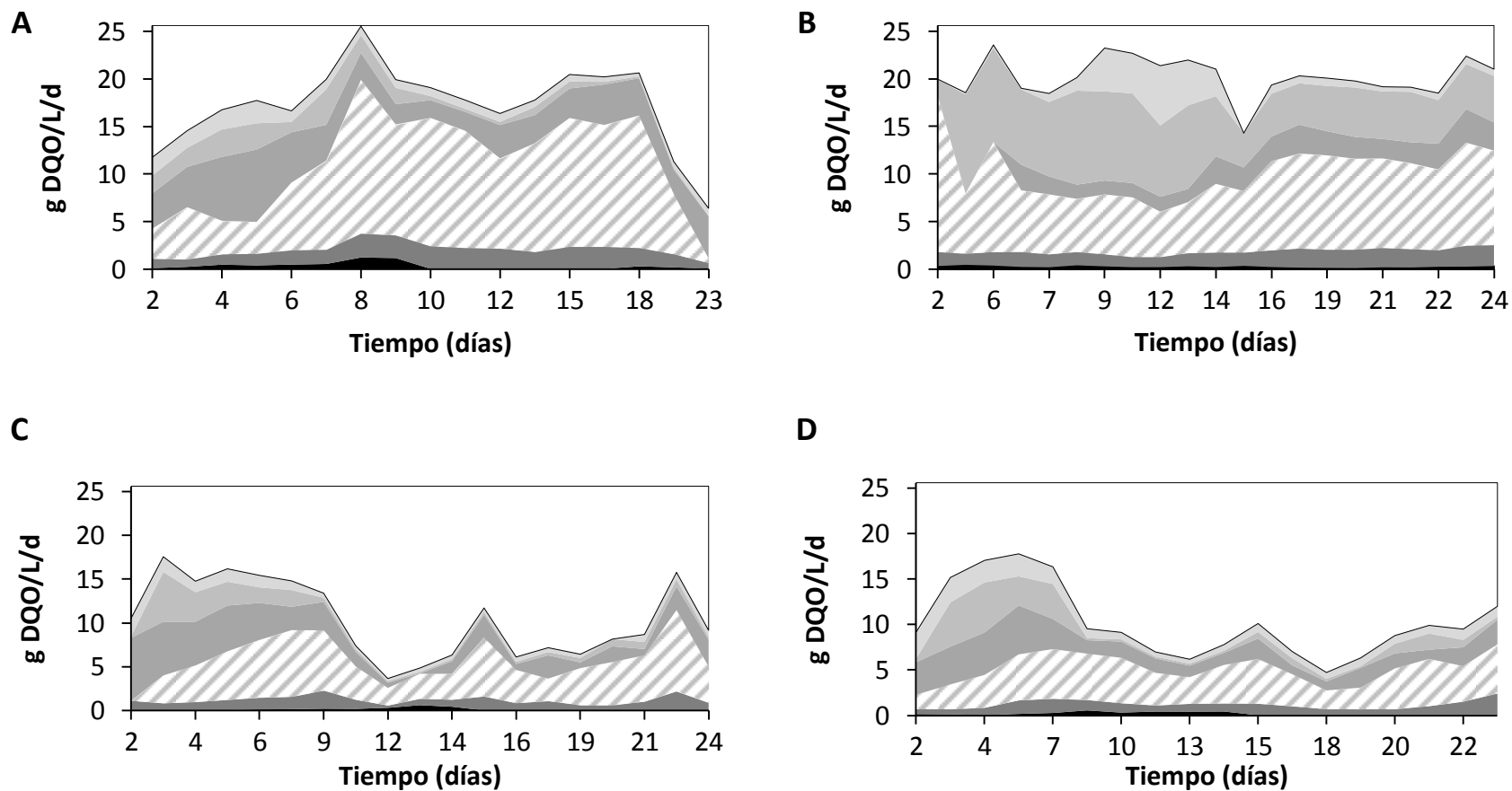
La concentración de sólidos volátiles en los reactores al final de la operación fue de 2.5, 0.96, 3.7 y 3 g/L para el EGSB1, EGSB2, EGSB3 y EGSB4, respectivamente. Se puede observar que hubo un apreciable lavado de biomasa, puesto que los reactores fueron inoculados con 9 g SSV/L. No obstante, a pesar del lavado, hubo crecimiento de biomasa que se pudo mantener dentro del reactor.



**Figura 6.** Eficiencia de consumo de glucosa ( $\diamond$ ) y rendimiento molar de hidrógeno ( $\blacksquare$ ) durante la operación de los reactores EGSB1 (A), EGSB2 (B), EGSB3 (C) y EGSB4 (D).



**Figura 7.** Concentración de sólidos suspendidos volátiles en el efluente de los reactores EGSB2 (A), EGSB3 (B) y EGSB4 (C).



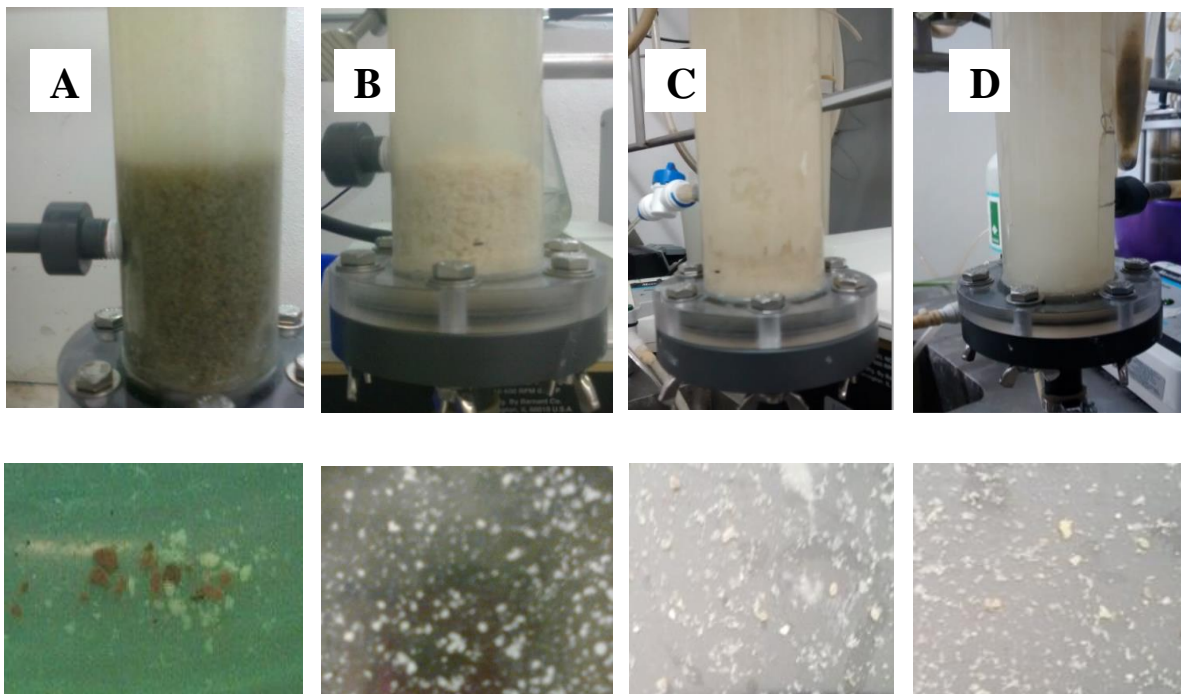
**Figura 8.** Balances de DQO durante la operación de los reactores EGSB1 (A), EGSB2 (B), EGSB3 (C) y EGSB4 (D).

Formiato (■), Acetato (■), Propionato (///), Butirato (■), Glucosa residual (■), Hidrógeno (■), No determinado (□)

### 3.6. Características físicas de los gránulos

#### 3.6.1. Color del gránulo

El color del inoculo era negro debido a la presencia de bacterias sulfatorreductoras que producen sulfuros de hierro presentes en los gránulos (Fang et al. 2002; Kosaric et al. 1990). Una vez tratada la biomasa e inoculados los reactores EGSB, conforme avanzó el tiempo de operación, la biomasa comenzó a cambiar a un color más claro entre café y crema. En el caso del EGSB1 en el día 10 empezó a notarse dicho cambio e incluso se distinguieron pequeños gránulos. Al final de la operación se notó una zona más concentrada de biomasa color café que era la zona de concentración de gránulos (Fig. 9A). En la Figura 9B se observa la biomasa del EGSB2 la cual fue más clara, de color crema, y estuvo concentrada en el fondo el reactor.



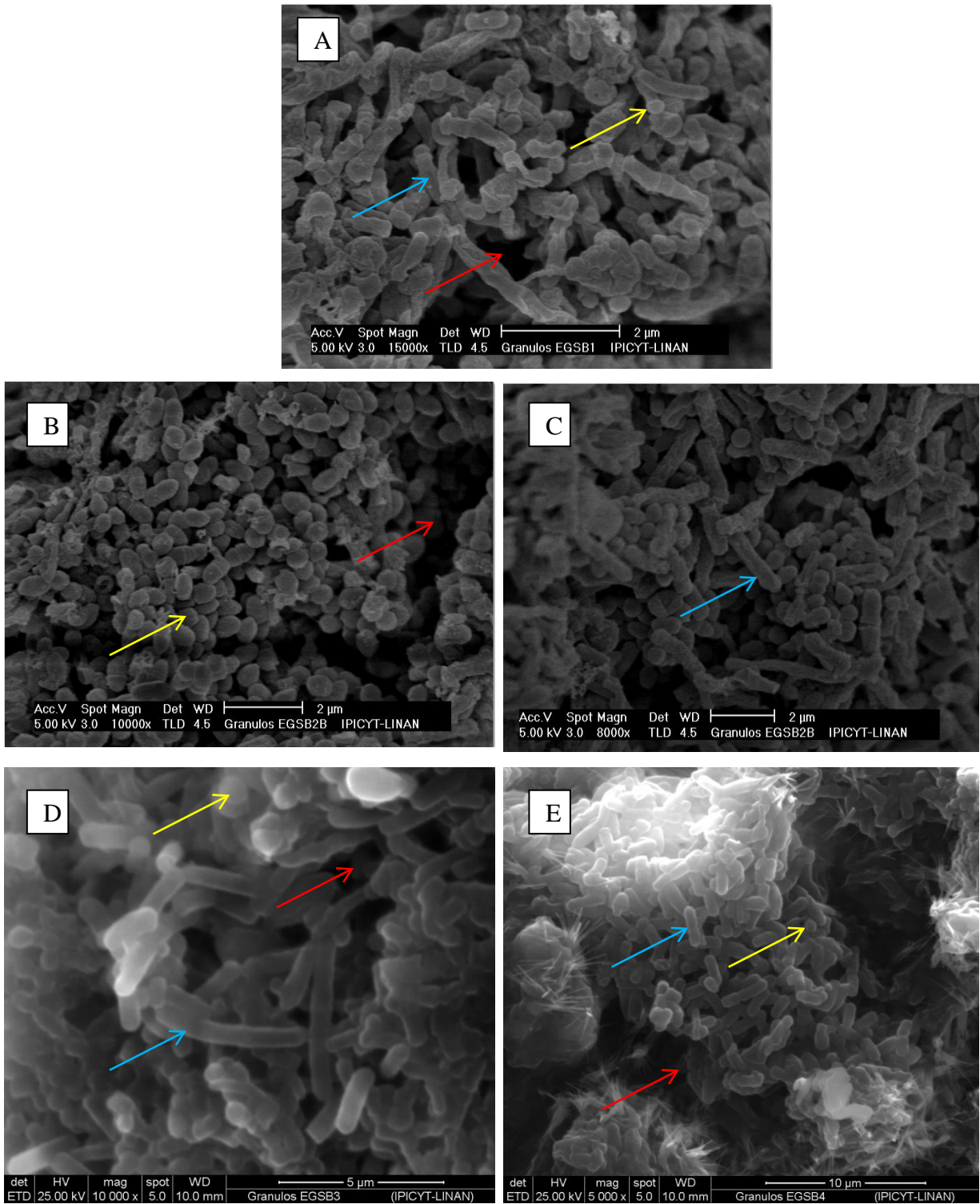
**Figura 9.** Fotografías tomadas del fondo de los reactores EGSB y color de los gránulos obtenidos a los 24 días de operación de los reactores EGSB1 (A), EGSB2 (B), EGSB3 (C) y EGSB4 (D).

La biomasa productora de hidrógeno ha sido caracterizada como color crema (Mu et al. 2006), sin embargo en este estudio se vio que también hubo gránulos más oscuros entre un café-cremoso (Fig. 9A). La biomasa del reactor EGSB3 (Fig. 9C) fue completamente de color crema, solo algunos mostraron un color café claro. La biomasa del reactor EGSB4 (Fig. 9D), también fue de color crema observándose muy pocos gránulos de color café claro.

### 3.6.2. Morfologías microscópicas

La Fig. 10 muestra las morfologías bacterianas encontradas en los gránulos hidrogenogénicos obtenidos al final de la operación de los reactores EGSB. Las bacterias que se distinguieron en los gránulos obtenidos de EGSB1 fueron principalmente de formas bacilares (flecha azul de Fig. 10A), y en menor cantidad, cocos (flecha amarilla Fig. 10B). En los gránulos de los 4 reactores del presente estudio también se pudieron observar los canales u orificios que permiten el flujo de sustrato hacia dentro de la estructura granular y la liberación de gas hacia el exterior de ésta (flechas rojas Fig. 10). En la Fig. 10B y 10C también se muestran las morfologías de los gránulos obtenidos del reactor EGSB2 y se pueden ver en ambas imágenes mayor cantidad de cocos que de bacilos. En cuanto a los reactores EGSB3 y EGSB4 (Fig. 10D y 10E, respectivamente), se observa que las formas predominantes fueron bacilares, al igual que las del reactor EGSB1, que puede ser debido a que los tres fueron inoculados con la misma biomasa sometida al tratamiento térmico. En un estudio realizado con un reactor completamente agitado, Fang et al. (2002) reportaron que hay dos morfologías predominantes, los bacilos fusiformes y los bacilos formadores de esporas, mientras que en otro estudio realizado por Mu et al. (2006), usando un reactor UASB se encontraron además cocos, lo que explican indicando que debido a la complejidad de este reactor, se favorece una comunidad más diversa. Esto puede explicar ambas formas encontradas en todos los reactores EGSB, ya que su funcionamiento es similar a los UASB y por lo tanto su complejidad también.



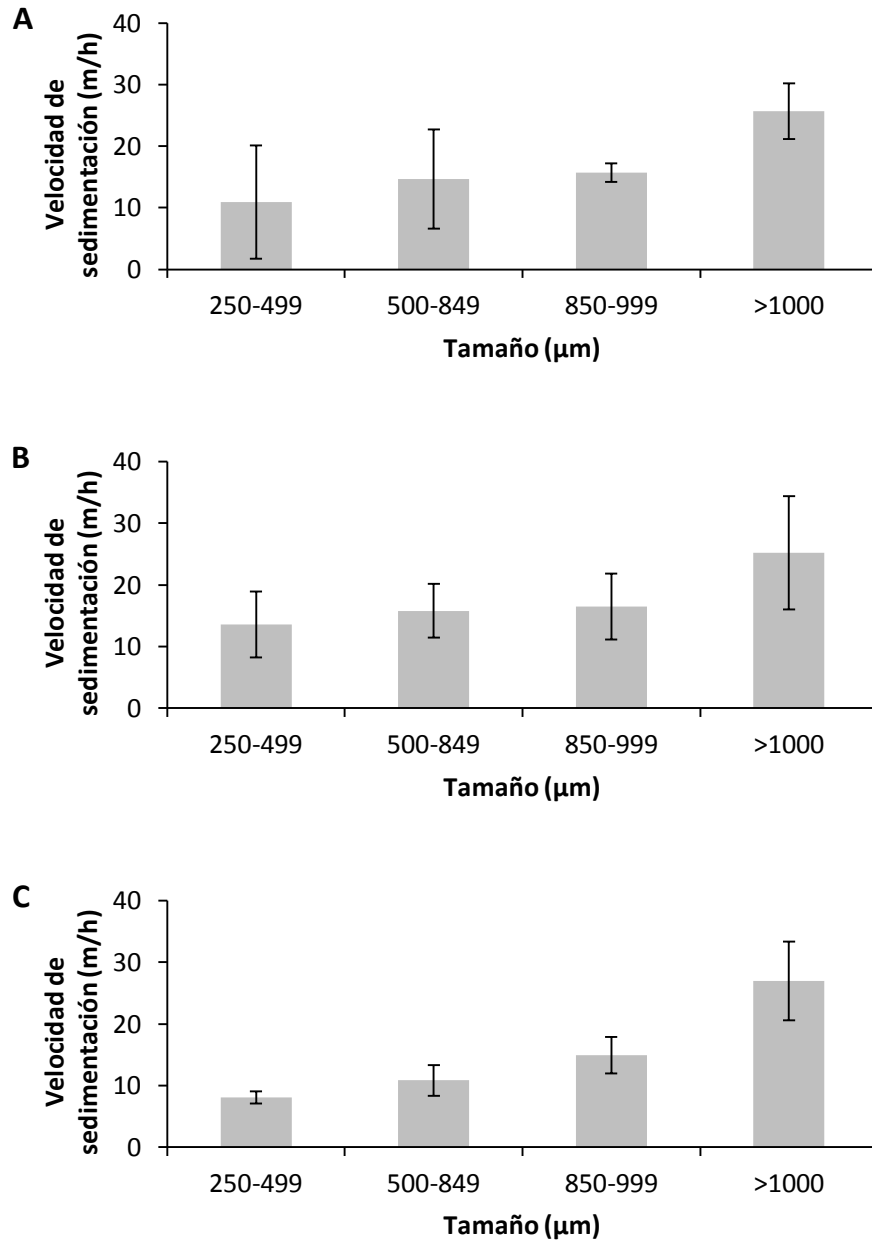


**Figura 10.** Imágenes de SEM de los gránulos al final de la operación (24 días) de los reactores EGSB1 (A), EGSB2 (B y C), EGSB3 (D) y EGSB4 (E). Bacilos (flecha azul), cocos (flecha amarilla), canales (flecha roja).

Finalmente se puede inferir que los dos tipos de tratamiento de eliminación de la metanogénesis aplicados al inóculo, así como las condiciones hidrodinámicas aplicadas a los reactores EGSB seleccionaron diferentes morfologías microbianas.

### 3.6.3. Velocidades de sedimentación

Las velocidades de sedimentación obtenidas en el EGSB1 fueron en promedio de  $25.7 \pm 4.5$  m/h para el gránulo de mayor tamaño ( $>1000 \mu\text{m}$ ), y de  $10.9 \pm 9.2$  m/h para la biomasa de diámetro menor (250-499) (Fig. 11). Estas velocidades fueron mucho mayores que las ascensionales aplicadas durante la operación, incluso las de la biomasa de menor diámetro, lo que indica que la capacidad de sedimentación fue la que impidió la salida de la biomasa granular del reactor. Como se ve en los resultados de las densidades (Tabla 3) todas cayeron en un rango de entre (999-1003  $\text{k/g/m}^3$ ), que son similares a las ya reportadas. Los valores de densidad obtenidos nos están indicando una estructura densa y compacta, por lo tanto esto explica las buenas capacidades de sedimentación y su retención en el reactor. En el caso del reactor EGSB2, no se pudo determinar la velocidad de sedimentación de los gránulos debido a que al tratar de manipularlos, se desintegraron, por lo tanto no presentaron una buena resistencia mecánica la cual es una característica fundamental para dar estabilidad a la biomasa granular y para una adecuada separación líquido-sólido del reactor (Pereboom 1997). Es claro que el tipo de tratamiento juega un papel determinante en la estructura de los gránulos y, muy probablemente, las morfologías bacilares. En el reactor EGSB3, los gránulos de mayor tamaño presentaron velocidades de  $25.23 \pm 9.1$  m/h y los de menor de  $13.53 \pm 5.3$  m/h. Finalmente los gránulos del EGSB4 tuvieron velocidades de  $27 \pm 6.3$  m/h para los más grandes y de  $8.04 \pm 1$  m/h, para los de menor tamaño.



**Figura 11.** Velocidades de sedimentación alcanzadas por los gránulos en relación a su diámetro obtenidos de los reactores EGSB1 (A), EGSB3 (B) y EGSB4 (C).

**Tabla 3.** Densidad de los gránulos de los reactores EGSB1, EGSB3 y EGSB4.

Reactor	Diámetro de gránulo ( $\mu\text{m}$ )	Vel. de sedimentación (m/h)	Densidad del gránulo ( $\text{kg/m}^3$ )
EGSB1	>1000	25.71	1003.44
	850-999	15.70	999.82
	500-849	14.67	1001.19
	250-499	10.91	1001.64
EGSB3	>1000	25.23	1002.04
	850-999	16.46	999.52
	500-849	15.80	1000.96
	250-499	13.53	1002.81
EGSB4	>1000	27.00	1002.02
	850-999	14.92	998.80
	500-849	10.82	998.61
	250-499	8.04	998.78

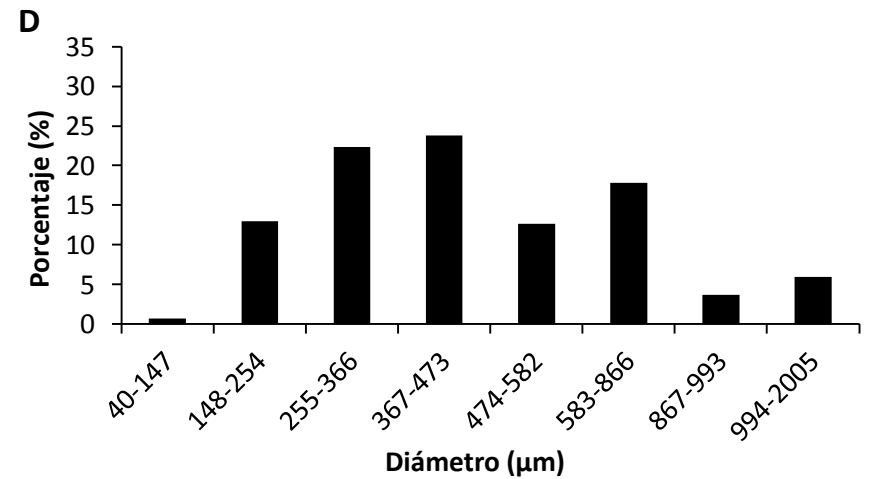
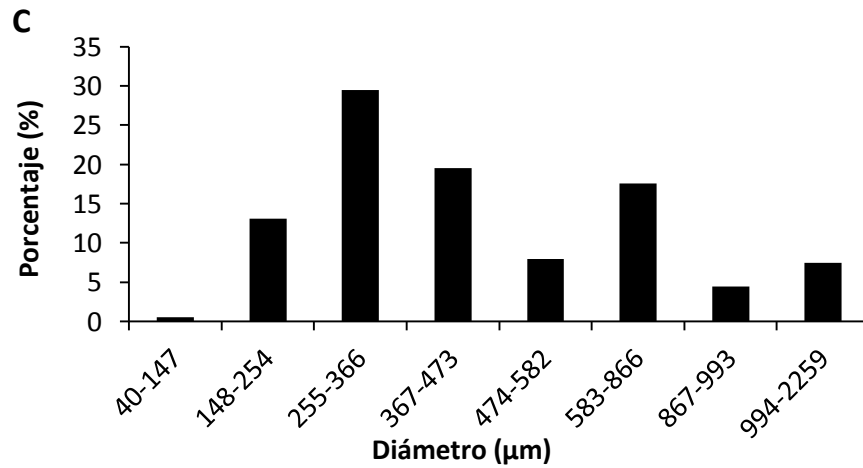
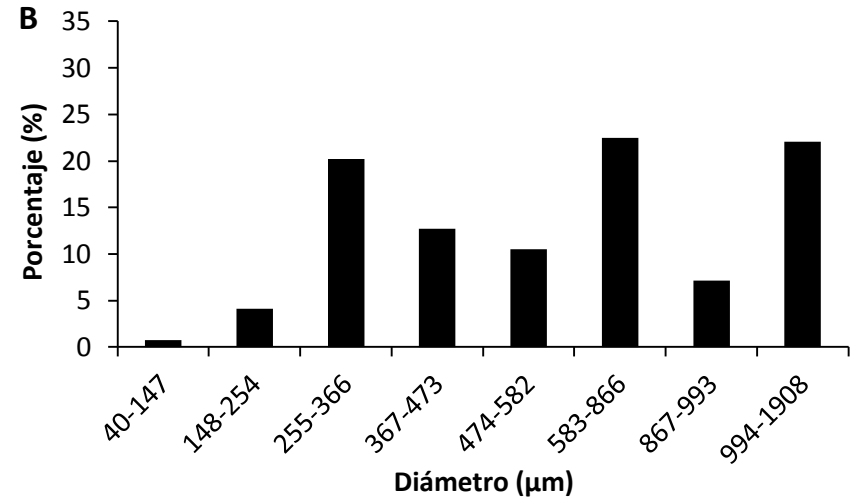
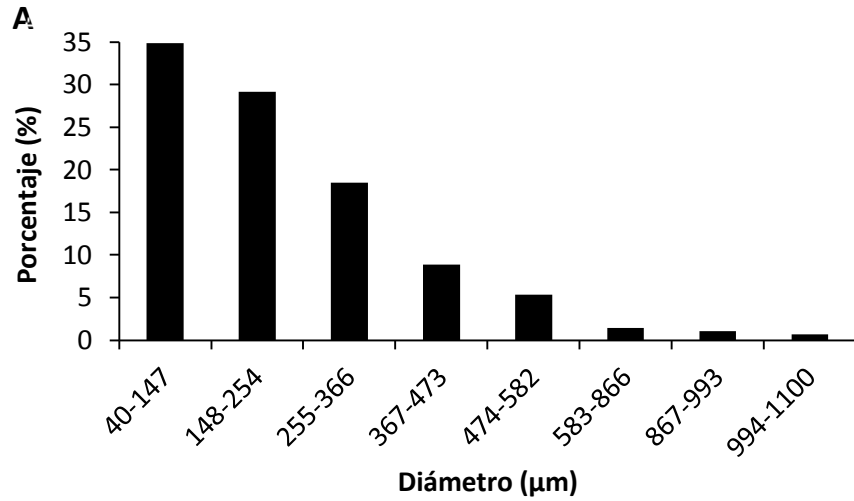
Es claro que en todos los casos el comportamiento fue similar, ya que los gránulos de mayor tamaño sedimentaban más rápido. Liu et al. (2009), señalaron que la velocidad de sedimentación de los flóculos está entre 0.17 y 0.42 cm/s (6.12-15.12 m/h). En cuanto a las velocidades de sedimentación de los gránulos productores de hidrógeno se han reportado desde 13 hasta 83.52 m/h (Liang et al. 2010, Mu et al. 2006, Zhang et al. 2008). Por lo que de acuerdo a estas conclusiones se puede deducir que en nuestros experimentos al final de la operación de los reactores logramos formar gránulos, especialmente de mayor tamaño conforme se incrementó la  $V_{up}$ . De acuerdo al número de Reynolds, el régimen de flujo en todos

los reactores cayó en el de transición y por lo tanto, la densidad del gránulo se calculó con la ecuación de Newton. La Tabla 3 muestra las densidades de los gránulos, obtenidas a partir de la velocidad de sedimentación y del diámetro promedio de los gránulos. Para los gránulos mayores a 1000  $\mu\text{m}$  se obtuvieron densidades de 1003, 1002 y 1002  $\text{kg/m}^3$  en los reactores EGSB1, EGSB3 y EGSB4, respectivamente. Para los gránulos más pequeños, se obtuvo una densidad promedio de 1000  $\text{kg/m}^3$ . Mu et al. (2006) reportaron una densidad de 1036  $\text{kg/m}^3$  para gránulos de entre 1 y 3.5 mm de diámetro. Las diferencias entre los diámetros de los gránulos entre este estudio y el de Mu et al. (2006) pueden explicar las diferencias en las velocidades de sedimentación y las densidades encontradas en ambos estudios.

#### 3.6.4. Tamaño de gránulo

Es importante mencionar la dificultad de definir el inicio del proceso de granulación, incluso aún no está bien definida la diferencia entre un flóculo y un gránulo. Se han mencionado algunas diferencias basadas básicamente en la resistencia mecánica y en las características de sedimentación, por ejemplo, los gránulos tienen estructuras más fuertes que los flóculos y con mejor sedimentación (Liu et al 2009). La dimensión fractal es una propiedad física que provee el índice de grado de compactación. Una alta dimensión fractal sugiere una estructura más densa y fuerte; en un estudio realizado por Mu et al. (2006b) se determinó que la dimensión fractal para gránulos productores de hidrógeno fue de 1.79, y fue comparada con la de flóculos, con valores de 2.11-2.48 (Zhang et al 2004), por lo tanto, con estas diferencias, los autores indicaron que los gránulos productores de hidrógeno son estructuras muy complejas cuyas propiedades fractales deben ser verificadas y estudiadas con más detalle. Por otro lado Dolfig (1987) definió como “fluffy pellets” a los aglomerados más débiles que los gránulos pero más consistentes que los flóculos. En cuanto a tamaño se ha encontrado un amplio rango de diámetros de gránulos metanogénicos que van desde 0.2 hasta 7 mm (Ross, 1984) y para hidrogenogénicos desde 0.2 hasta 4.2 mm (Chang et al.

2004, Jung et al. 2011, Mu et al. 2006, Zhang et al. 2008). En nuestro estudio, el tamaño de partícula de la biomasa al inocularse los cuatro EGSB fue de 250  $\mu\text{m}$ . Al terminar la operación de los reactores, se midieron los diámetros de aproximadamente 300 y 500 gránulos para cada reactor (Fig. 12). Al final del periodo del EGSB1, el diámetro varió desde 40  $\mu\text{m}$  hasta 1100  $\mu\text{m}$  (Fig. 12 A). Los gránulos más pequeños fueron los más abundantes. En cuanto a la distribución, en el reactor EGSB2, estuvo sesgada a la derecha mostrando formación de gránulos más grandes que alcanzaron un diámetro de hasta 1900  $\mu\text{m}$  pero mucho menos resistentes, puesto que se desintegraron al tratar de manipularlos. Este reactor fue el que presentó mayor concentración de propionato, y se ha demostrado que de entre las especies productoras de éste metabolito, las propionibacterias tienen la capacidad de producir exopolisacáridos (Cerning 1995), por lo que quizá fueron estas las responsables de la formación de la estructura granular en EGSB2, sin embargo no fue lo suficientemente rígida. En el EGSB3 la distribución estuvo un poco sesgada a la derecha y se encontraron gránulos de 2259  $\mu\text{m}$ . En el EGSB4 la distribución fue más simétrica, lo que implica que conforme aumentó la velocidad ascensional, aumentó la proporción de gránulos de mayor diámetro. Guiot (1988) encontró algo parecido en lodo granular metanogénico, él observó que al aumentar la velocidad ascensional de 1 m/h a 2 m/h aumentó el diámetro de las partículas. Fang et al. (2002) en un estudio realizado en un fermentador alimentado con sacarosa, observaron en el día 25 un diámetro de gránulo productor de hidrógeno de alrededor de 0.4 mm, que cae dentro del rango obtenido en el presente estudio. Además, en nuestro caso, se logró formar gránulos de 2.2 mm, que en el estudio de Fang et al. (2002) se forman en el día 40. En otro estudio, Mu y Yu (2006) observan formación de pequeños gránulos de 0.5 mm en el día 140, y después de 60 días más de operación, alcanzaron diámetros de 2 mm. Por lo que se podría concluir que las  $V_{\text{up}}$  en nuestro estudio aceleraron el proceso de granulación.



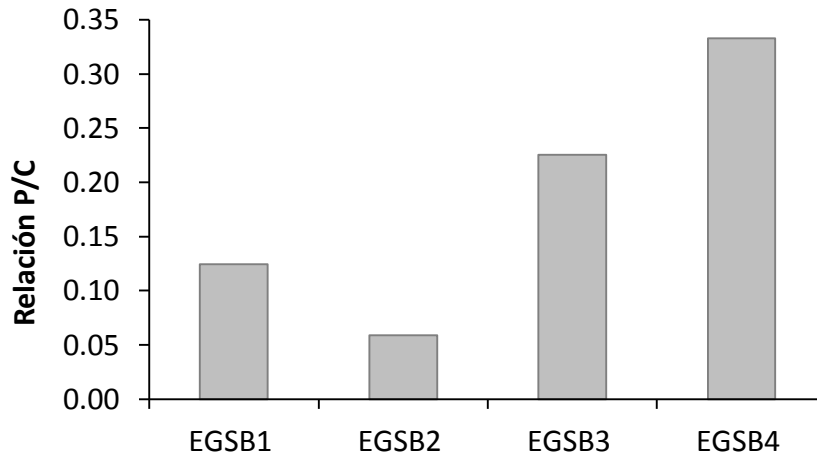
**Figura 12.** Distribución de tamaños de los gránulos hidrogenogénicos a los 24 días de operación de los reactores EGSB1 (A), EGSB2 (B), EGSB3 (C) y EGSB4 (D).

### 3.7. Características químicas de los gránulos

#### 3.7.1. Sustancias poliméricas extracelulares

A la biomasa obtenida de cada reactor, al final de su operación, se le determinó la relación proteínas/carbohidratos (P/C). La Fig. 13 muestra las relaciones P/C obtenidas. Las concentraciones de carbohidratos para la biomasa del EGSB1, EGSB2, EGSB3 y EGSB4 fueron de 19.4, 85.6, 71.07 y 38.4 mg/L respectivamente y las de proteínas fueron de 2.42, 5.02, 16.02 y 12.78 mg/L respectivamente. Para el EGSB1, EGSB3 y EGSB4 se obtuvo una relación P/C de 0.12, 0.23 y 0.33 respectivamente. Para el caso del reactor EGSB2 la relación es la menor con un valor de 0.06. Se ha señalado que los gránulos productores de hidrógeno tienen una relación proteínas/carbohidratos que varía entre 0.2 y 0.6. Mu et al. (2006), observaron una relación de 0.6. (Zhang et al. 2007), mientras que Fang et al. (2002) observaron una relación P/C de 0.2 en gránulos productores de hidrógeno. Zhang et al. (2007) observaron una disminución en la relación P/C conforme avanza el proceso de maduración, indicaron que al inicio de la granulación la relación P/C era de 0.5 y posteriormente disminuyó hasta 0.2. En este sentido, Zhang et al. (2008) señalan que el contenido de proteínas es fundamental al inicio de la granulación y el de los carbohidratos en su estructura y durante la maduración. Nuestros resultados demuestran el papel de los carbohidratos en el proceso de la granulación y que en efecto se seleccionaron inóculos completamente diferentes con los pretratamientos, ya que las diferencias más notorias en la relación P/C y resistencia mecánica fueron entre los gránulos del EGSB1 y EGSB2. Por otro lado, el incremento en la relación P/C fue proporcional al incremento en la velocidad ascensional aplicada a los reactores EGSB1, EGSB3 y EGSB4 conforme aumentó la velocidad ascensional.





**Figura 13.** Relación proteínas/carbohidratos de los gránulos obtenidos de los reactores EGSB1, EGSB2, EGSB3 y EGSB4.

### 3.8. Características biológicas

#### 3.8.1. Actividad hidrogenogénica

La Tabla 4 muestra los valores obtenidos de la actividad hidrogenogénica específica para los inóculos y la biomasa obtenida al final de la operación de los reactores, después de ajustar las cinéticas al modelo de Gompertz y del último día de la operación del reactor. Estos resultados permiten ver que, según el modelo, la biomasa obtenida del reactor EGSB1 inició su producción de hidrógeno ( $\lambda = -1.59$ , el signo negativo indica que no hubo fase de adaptación), casi 1 día antes que la biomasa usada para inocular dicho reactor (IT1) ( $\lambda = 21.84$ ). Esto posiblemente se debió a que la biomasa del reactor EGSB1 que se usó para determinar la AHE ya estaba aclimatada, mientras que la biomasa que se usó para determinar la AHE del inóculo estuvo almacenada después de aplicarle tratamiento térmico y tardó más en adaptarse a las condiciones del medio. La Fig. 14 muestra la actividad hidrogenogénica de los inóculos y de la biomasa productora de hidrógeno de los reactores EGSB1 y EGSB2. En las figuras se grafica el modelo de Gompertz y los resultados experimentales obtenidos de las cinéticas realizadas por triplicado. La

actividad hidrogenogénica específica es la velocidad de producción de hidrógeno por gramo de biomasa por día. Dichas actividades para el inóculo y la biomasa del reactor EGSB1 fueron de 621 y 127 mL H<sub>2</sub>/gSSV/d respectivamente (Tabla 4). El mismo caso ocurrió con el inóculo (IT2) y la biomasa del reactor EGSB2, donde la AHE fue mayor para el inóculo que para la biomasa granular obtenida al final de la operación del reactor con valores de 61 y 43 mL H<sub>2</sub>/gSSV/d, respectivamente. Esto significa que cada gramo de ambos inóculos produjo más litros de hidrógeno que la biomasa desarrollada en los reactores, posiblemente debido a que en el inóculo había mayor cantidad de especies microbianas capaces de producir hidrógeno, y que debido a las condiciones de operación de los reactores, como el TRH, no logran mantenerse dentro de ellos. La H<sub>max</sub> fue mayor para el inóculo tratado térmicamente (IT1) y menor para el inóculo lavado en el reactor CSTR (IT2), por las distintas especies microbianas seleccionadas.

Analizando la composición de los metabolitos secundarios (Fig. 16) se ve que en el IT2 prevaleció el propionato y en el EGSB2 fue prácticamente fermentación propiónica. Estos resultados coinciden con la baja producción de hidrógeno en la cinética de EGSB2, donde el propionato fue desfavorable para la producción de dicho gas. Es por ello que a pesar de que no se tuvo actividad metanogénica, la producción de hidrógeno fue inhibida por la concentración de propiónico en los experimentos de las AHE del IT2 y EGSB2. En un estudio realizado por Zhang et al (2006), mencionan que a TRH aproximadamente de 6 h disminuyó considerablemente la producción de propionato, debido posiblemente a que a estos TRH las bacterias que lo producen son lavadas del sistema. En el presente estudio se aplicó un TRH de 8 h durante la operación del CSTR, por lo que debido a las altas concentraciones de propionato en la cinética del IT2 (~7,700 mg/L) posiblemente cosechamos un gran número de especies productoras de propionato (Fig. 16B). En el caso del IT1 y EGSB1, la producción de propionato fue mayor, debido a que el tipo de fermentación fue mixta y hubo más producción de acetato. Cabe mencionar que las bacterias propiónicas son capaces de sobrevivir al tratamiento térmico como *Propionibacterium* (Madigan et al. 2000). En cuanto a la biomasa del reactor EGSB3, se obtuvo un volumen máximo de producción de

hidrógeno de 139 mL y para la del EGSB4 de 142 mL (Fig. 15). Las actividades hidrogenogénicas específicas revelan que la mayor fue la del inóculo sometido a tratamiento térmico, en comparación a las de los reactores EGSB1, EGSB3 y EGSB4. Comparando los reactores inoculados con la misma biomasa, se observa que las AHE de los EGSB3 y EGSB4 (Tabla 4), fueron muy similares y mayores a la del EGSB1, por lo que posiblemente influyó de manera muy similar el aumento en la  $V_{up}$  a 3.5 y 4.5 m/h. El metabolito predominante en las cinéticas de los gránulos de EGSB1, EGSB3 y EGSB4, fue butirato, indicando una buena ruta metabólica para producción de hidrógeno. Al relacionar el volumen máximo acumulado obtenido con el estudio realizado por Dávila et al. (2008) donde usa una concentración de glucosa y un pH inicial de 5 g/L y 7.5 respectivamente, el volumen acumulado fue de 96.5 mL, que es un valor cercano a los alcanzados en el presente estudio. Las diferencias podrían ser por las concentraciones de sustrato usadas en ambos estudios. La AHE determinadas en el último día de operación de los reactores, tomando en cuenta la concentración final de SSV determinados el día de operación 24 (Tabla 4), muestran claramente valores distintos a las AHE determinadas en lote. Se conoce que un cultivo en lote se diferencia del continuo en que las condiciones cambian constantemente con el tiempo ya que éstas son modificadas por los mismos microorganismos y por lo tanto pueden estar ocurriendo cambios radicales en la composición química del medio conforme avanza la cinética, por lo que esta puede ser una de las principales razones que expliquen las diferencias.

Las AHE determinadas en los reactores (Tabla 4) siguen un comportamiento similar al observado en las VVPH y rendimientos molares (Tabla 2), donde dichos valores disminuyen en EGSB3 en comparación con EGSB1, pero después aumentan al usar EGSB4, confirmando los mejores resultados obtenidos en el EGSB4.

**Tabla 4.** Parámetros obtenidos al ajustar las cinéticas de producción de hidrógeno de los inóculos y los gránulos al final de la operación de los reactores EGSB, al modelo de Gompertz.

	<b>Hmax<sup>a</sup></b> <b>(mL)</b>	<b>Rmax<sup>b</sup></b> <b>(mL/h)</b>	<b><math>\lambda^c</math></b> <b>(h)</b>	<b>AHE<sup>d</sup></b> <b>(mLH<sub>2</sub>/gSSV/d)</b>	<b>AHE<sup>e</sup></b> <b>(mLH<sub>2</sub>/gSSV/d)</b>
<b>IT1</b>	137.84	7.41	21.84	621.15 (109)	-
<b>IT2</b>	7.65	0.686	12.04	61.29 (28)	-
<b>EGSB2</b>	10.72	1.04	4.06	43.09 (16)	-
<b>EGSB1</b>	93.63	2.12	-1.59	127.49 (24)	574
<b>EGSB3</b>	139.7	4.22	5.47	401.25 (27)	380.54
<b>EGSB4</b>	142.24	4	2.05	424.29 (6)	718.4

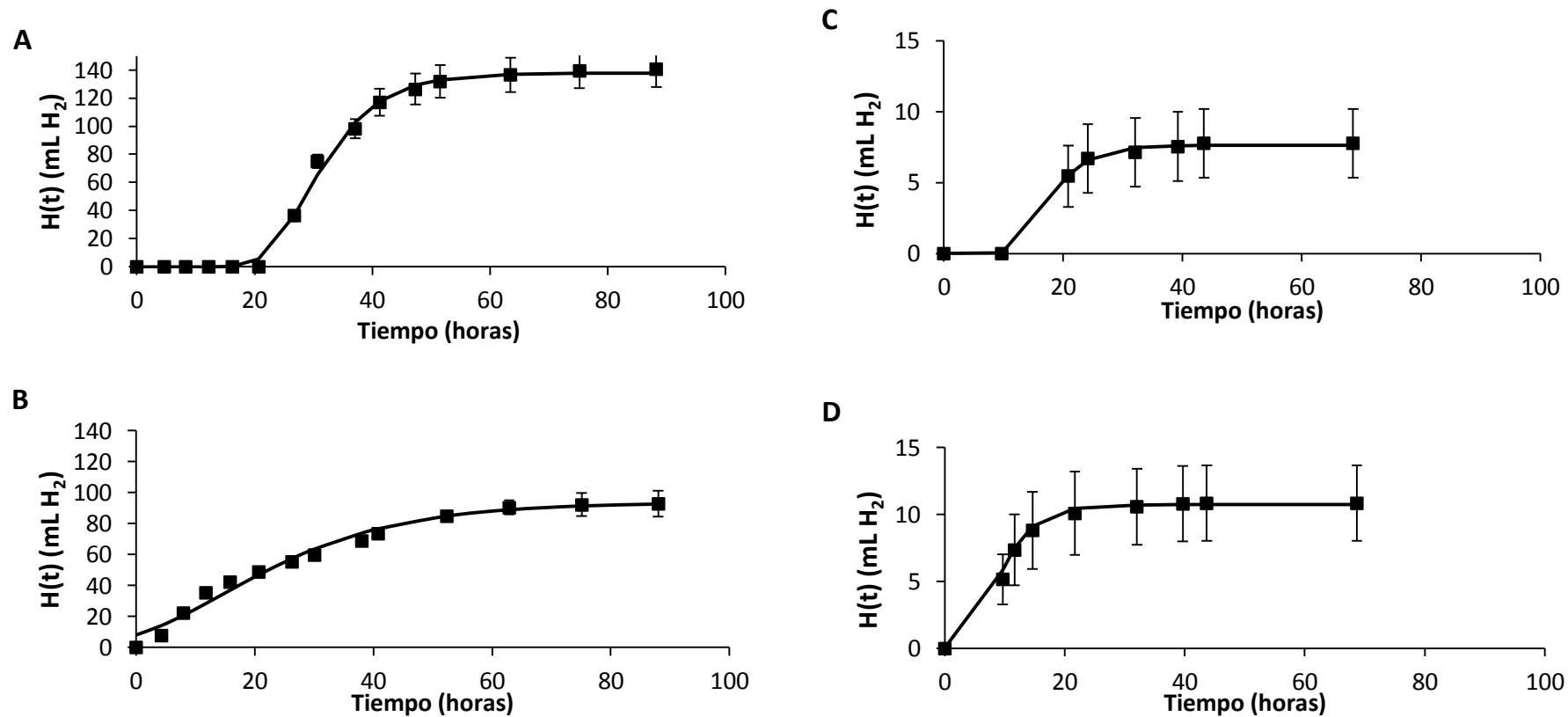
<sup>a</sup>Máxima cantidad de hidrógeno producido

<sup>b</sup>Máxima velocidad de producción de hidrógeno

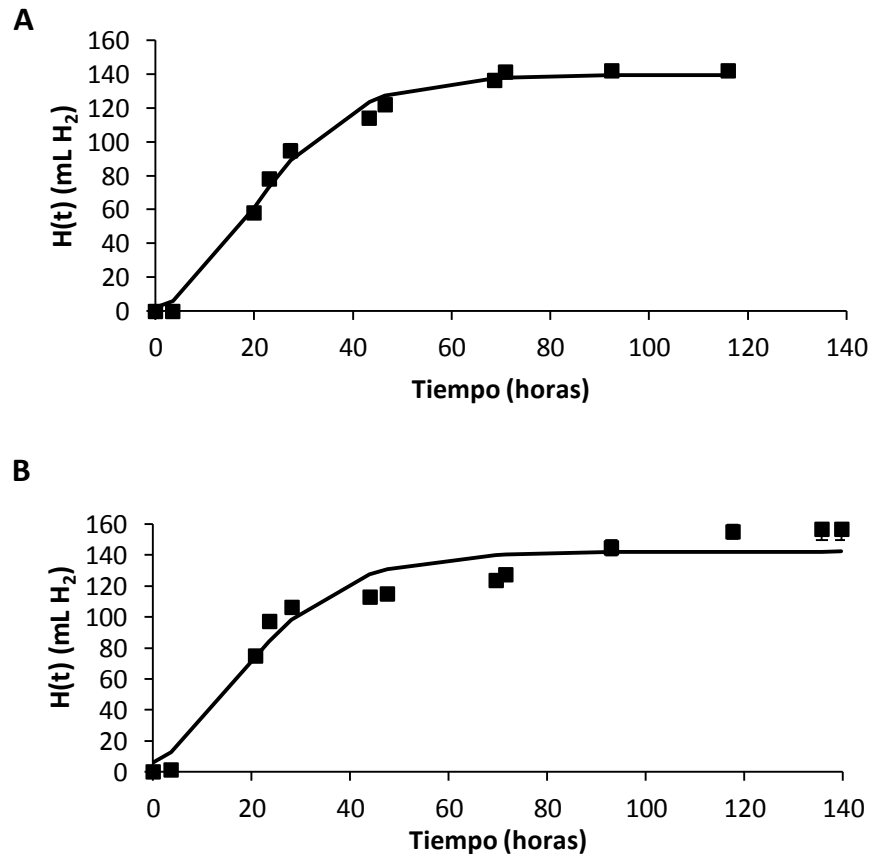
<sup>c</sup>Duración de la fase lag (adaptación)

<sup>d</sup>Actividad hidrogenogénica específica

<sup>e</sup>Actividad hidrogenogénica específica el día 24 de la operación del reactor, tomando en cuenta las concentraciones de SSV determinadas en ese día.



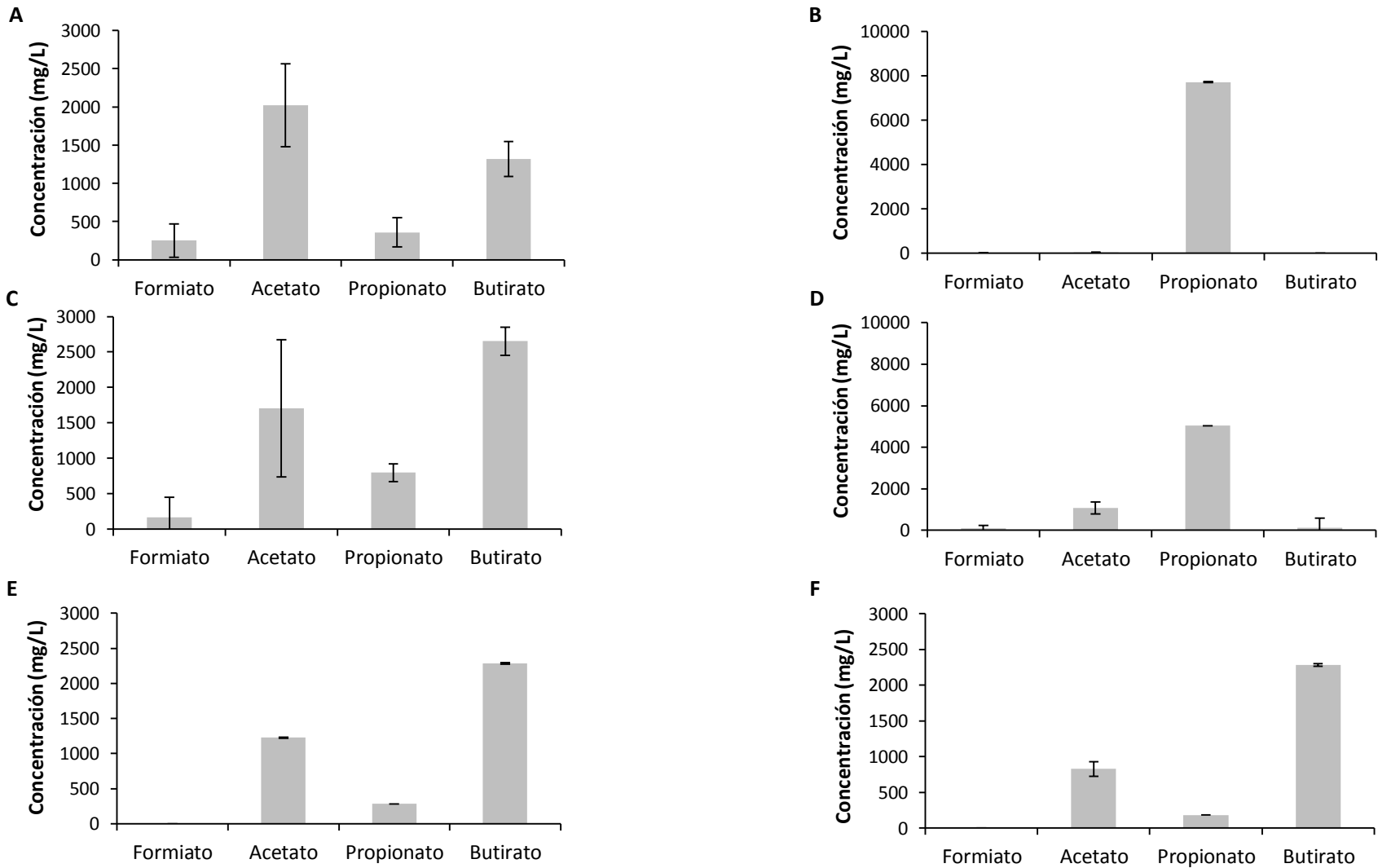
**Figura 14.** Volumen acumulado de hidrógeno (■) del inóculo sometido a tratamiento térmico, IT1 (A), los gránulos obtenidos del reactor EGSB1 (B), el inóculo sometido a lavado en CSTR, IT2 (C) y, los gránulos obtenidos del reactor EGSB2 (D). Modelo de Gompertz (-).



**Figura 15.** Volumen acumulado de hidrógeno (■) de las cinéticas realizadas a: (A) los gránulos obtenidos del reactor EGSB3 y, (B) los gránulos obtenidos del reactor EGSB4. Modelo de Gompertz (-).

### 3.9. Efecto de la velocidad ascensional.

La  $V_{up}$  aplicada en los reactores no tuvo un efecto marcado en las VVPH y los rendimientos molares de los reactores, aunque los valores en el reactor EGSB4 fueron un poco superiores. Así mismo, las condiciones aplicadas en los EGSB1, EGSB3 y EGSB4 seleccionaron predominantemente bacterias productoras de ácido propiónico, sin embargo, conforme se aumentó la  $V_{up}$ , se observó una disminución considerable en la producción de éste ácido.



**Figura 16.** Distribución de los ácidos grasos volátiles obtenidos al final de las actividades hidrogenogénicas del inóculo sometido a tratamiento térmico, IT1 (A), y el sometido a lavado en CSTR, IT2 (B), gránulos de los reactores EGSB1 (C), EGSB2 (D), EGSB3 (E) y EGSB4 (F).

En efecto, el aumento de la  $V_{up}$  afectó notablemente la concentración de metabolitos, donde se vio un aumento significativo de productos no determinados, que posiblemente estuvo relacionada a la producción de sustancias poliméricas extracelulares, distintos AGVs y alcoholes como se mencionó anteriormente. En cuanto al efecto en la formación de biomasa granular, se observó que al incrementar la  $V_{up}$ , el porcentaje de los gránulos de mayor tamaño aumentó y, a su vez, sus velocidades de sedimentación mejoraron. Así mismo, la relación P/C de los gránulos aumentó al incrementar  $V_{up}$ , lo que pudo estar relacionado al estrés que sufrió la biomasa por el mayor esfuerzo de corte ejercido, dicho efecto se ha observado en la formación de gránulos anaerobios y aerobios donde a mayor esfuerzo de corte se produjo mayor cantidad de SPE (Vieira et al. 1993, Tay et al. 2001, Noyola et al. 1994). Al realizar los experimentos en lote se observó que la mayor AHS fue para los gránulos del EGSB4, indicado una posible relación con el incremento de  $V_{up}$ . Se observaron diferencias entre las AHS realizadas en lote y las calculadas para el último día de operación de los reactores EGSB1, EGSB3 y EGSB4, sin embargo, estas AHS calculadas en el último día se correspondieron con los datos de VVPH y rendimientos molares promedio obtenidos durante la operación de los reactores.



## Capítulo 4. Conclusiones y perspectivas

### 4.1. Conclusiones

Los distintos pretratamientos del inóculo efectivamente lograron seleccionar especies microbianas con distintas capacidades de producción de hidrógeno. Así mismo, al usar los distintos inóculos pretratados en los reactores EGSB, se logró formar biomasa granular. La biomasa tratada térmicamente formó gránulos, en el reactor EGSB1, con mejor resistencia a la manipulación, una relación P/C mayor, distintas morfologías bacterianas, siendo los bacilos los de mayor abundancia, y con mejor AHE en cultivo en lote que los gránulos formados en el reactor EGSB2, inoculado con biomasa lavada en el CSTR.

Se lograron formar gránulos bacterianos usando las  $3 V_{up}$ , por lo que se demostró que los reactores EGSB1, EGSB3 y EGSB4, con las condiciones usadas son adecuados para la formación de biomasa granular.

Las velocidades ascensionales no mostraron tener un impacto significativo en la velocidad volumétrica de producción de hidrógeno promedio, ni en los rendimientos molares usando  $V_{up}$  de 2.5 y 3.5 m/h, ya que la ruta metabólica predominante fue la de producción de propionato, sin embargo, hubo un ligero incremento en la VVPH y en el rendimiento molar al usar la  $V_{up}$  de 4.5 m/h.

Así mismo los gránulos de los reactores EGSB1, EGSB3 y EGSB4 tuvieron buenas capacidades de sedimentación, con valores muy cercanos a los de la literatura. El efecto más relevante al aumentar la  $V_{up}$  se observó en el incremento del porcentaje de gránulos de mayor tamaño, posiblemente porque se estimuló la producción de sustancias poliméricas extracelulares.

Las AHE fueron mayores para los inóculos que para la biomasa granular obtenida al final de los reactores, quizá por el proceso de selección de especies microbianas realizado durante los 24 días de operación. La  $V_{up}$  de 4.5 m/h también tuvo un efecto positivo en el cultivo en lote ya que la biomasa granular del EGSB4 produjo el mayor valor de AHE.

Como conclusión general podemos afirmar que la hidrodinámica juega un papel relevante en la formación de gránulos hidrogenogénicos, así como en su tamaño y velocidades de sedimentación, indicando que la hipótesis planteada fue correcta.

#### 4.2. Perspectivas

Sería conveniente estudiar el efecto de  $V_{up}$  ascensionales superiores a 4.5 m/h para determinar a que condiciones se obtiene una proporción de gránulos de mayor tamaño y con las mejores características de sedimentación; en el mismo sentido, verificar si a unas condiciones dadas se pueden lavar completamente las bacterias productoras de propiónico como lo indica la tendencia.

Así mismo, sería conveniente identificar las especies microbianas tanto en los inóculos como en los gránulos obtenidos de los reactores, para poder estudiar la ecología de los microorganismos productores de hidrógeno y de los no productores de hidrógeno, como es el caso de las bacterias productoras de propiónico, con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas que permitan la predominancia de los primeros.

## Capítulo 5. Referencias

- Abreu A. A., Alves J. I., Pereira M. A., Karakashev D., Alves M. M., Angelidaki I. Engineered heat treated methanogenic granules: A promising biotechnological approach for extreme thermophilic biohydrogen production. *Bioresour Technol* 2010; 101: 9577-9586.
- Agler M. T., Wrenn B.A., Zinder S. H., Angenent L.T. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform *Trends Biotechnol* 2011; 29: 70-78
- Ahn Y. H. Physicochemical and microbial aspects of anaerobic granular biopellets. *J Environ Sci Heal* 2000; A35 (9): 1617-1635.
- Alatorre F. C. Energías renovables para el desarrollo sustentable en México. 2009, México.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M. *Molecular biology of the cell*. Fourth edition. 2002, USA: Garland Science. 565-566.
- Allison D. G., McBain A. J., Gilbert P. Biofilms: problems of control. In *Society for General Microbiology Symposium: Community Structure and Co-operation in Biofilms* (ed. D.G. Allison, P. Gilbert, H.M. Lappin-Scott y M. Wilson), 2000; 59: 309-328, University Press, Cambridge, UK.
- Antonopoulou G., Gavala H. N., Skiadas I. V., Angelopoulos K., Lyberatos G. Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresource Technology* 2008; 99: 110-119.
- APHA. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. USA: American Public Health Association; 1998.
- Baghchehsaraee B., Nakhla G., Karamanev D., Margaritis A., Reid G. The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. *Int J Hydrogen Energy* 2008; 33: 4064-4073.
- Bradford M. A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-254

- Cerning J., Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*. 1995, 75: 463-472.
- Chang F.Y., Lin C.Y. Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *Int. J. Hydrogen Energy* 2004; 29: 33–39.
- Chang J., Wu J., Wen F., Hunk k, Chen Y., Hsiao C., Lin C., Huang C. Molecular monitoring of microbes in a continuous hydrogen-producing system with different hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy* 2008; 33: 1579-1585.
- Characklis W. G., Wildere P. A. Glossary. In: Characklis WG, Wildere PA (eds) *Structure and function of biofilms*. Wiley, Chichester, 1989; 369-371.
- Chen M.J., Zhang Z., Bott T.R. Direct measurement of the adhesive strength of biofilms in pipes by micromanipulation. *Biotechnol Tech* 1998; 12: 875–880.
- Conte M., Iacobazzi A., Ronchetti M., Vellone R. Hydrogen economy for a sustainable development: state-of-the-art and technological perspectives *Journal of Power Sources* 2001; 100: 171–187.
- Crittenden J. C., Rhodes R., Hand D., Howe K. *Water treatment: Principles and design*. Second edition. 2005, USA: Wiley. 782-786.
- Darnell J., Lodish H., Baltimore D. *Molecular Cell Biology*, 1986 New York: Scientific American Books.
- Davies D. G. Physiological events in biofilm formation. In *Society for General Microbiology symposium: Community Structure and Co-operation in Biofilms* (ed. D.G. Allison, P. Gilbert, H.M. Lappin-Scott y M. Wilson), University Press, Cambridge, UK. 2000; 59: 37-52
- Davila-Vazquez G., Alatraste-Mondragón F., de León-Rodríguez A., Razo-Flores E. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *Int. J. Hydrog. Energy* 2008; 33: 4989–4997.
- Davila-Vazquez G., Arriaga S., Alatraste-Mondragón F., de León-Rodríguez A., Rosales-Colunga, L. Razo-Flores E. Fermentative hydrogen production: trends and perspectives. *Environ Sci and Biotechnol* 2007; 7: 27–45.

- Davila-Vazquez G., de León-Rodríguez A., Alatríste-Mondragón F., Razo-Flores E. The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. *Biomass Bioenergy* 2011; 35: 3174–3181
- De Amorim E. L. C., Takano L., Silva E. Effect of substrate concentration on dark fermentation hydrogen production using an anaerobic fluidized bed reactor. *Appl Biochem Biotechnol* 2012; 166: 1248-1263.
- De Man A. W. A., VanderLast A. R. M., Lettinga G. The use of EGSB and UASB anaerobic systems for low strength soluble and complex wastewaters at temperatures ranging from 8 to 30°C. In: E. R. Hall and P. N. Hobson (eds.), *Proceedings of the Fifth International Symposium on Anaerobic Digestion*, Bologna, Italy. Pergamon, Oxford 1988; U.K. 197-209
- Do Sacramento E.M., De Lima L.C., Oliveria C.J., Veziroglu T.N. A hydrogen energy system and prospects for reducing emissions of fossil fuels pollutants in the Ceara state-Brazil. *Int. J. Hydrogen Energ* 2008; 33: 2132-2137
- Dolfing, J. Microbiological aspects of granular methanogenic sludge. PhD-thesis, Agricultural University of Wageningen, The Netherlands, 1987.
- Dubois M, Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substrates. *Anal Chem* 1956; 28(3): 350-356.
- Dürre Peter. *Handbook on Clostridia*, 2005, USA. Taylor & Francis Group, LLC. Pp 492.
- Fang H. H. P., Liu H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Biores Technol* 2002; 82: 87–93.
- Fang H. H. P., Liu H., Zhang T. Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnol Bioeng* 2002; 78: 44-52.
- Fuentes M., Scenna N., Aguirre P. A coupling model for EGSB bioreactors: Hydrodynamics and anaerobic digestion processes. *Chem Eng Process* 2011; 50: 316-324
- Guiot S. R., Pauss A., Bourque D., El Housseini M., Lavoie L., Beaulieu C., Samson R., Effect of upflow liquid velocity on granule size distribution in an upflow anaerobic bed-filter (UBF) reactor. In: (A. Tilche and A. Rozzi eds.) *Poster Papers of the Fifth International Symposium on Anaerobic Digestion*, Monduzzi Editore, Bologna, Italy 1988; 121-112

- Guo W. Q., Ren N., Chen Z. B., Liu B. F., Wang X. J., Xiang W. S., Ding J. Simultaneous biohydrogen production and starch wastewater treatment in an acidogenic expanded granular sludge bed reactor by mixed culture for long-term operation. *Int J Hydrogen Energy* 2008a; 33: 7397-7404.
- Guo W. Q., Ren N., Wang X. J., Xiang W. S., Meng Z. H., Ding J., Qu Y. Y. Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *Int J Hydrogen Energy* 2008b; 33: 4981-4988.
- Guo X. M., Trably E., Latrille E., Carrere H., Steyer J-P. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: a review. *Int J Hydrogen Energy* 2010; 35:1066-1073.
- Hafez H., Elbeshbishy E., Nakhla G., Naggar M. H. El. Simulating the impact of suppression of methanogenesis in continuous flow biohydrogen reactors. *Int. J. Hydrogen Energy* 2011; 5885–5894.
- Hafez H., Nakhla G., El Naggar H. Biological hydrogen production S.A. Sherif (Ed.), *Handbook of hydrogen energy*, CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, 2012.
- Hawkes F. R., Dindale R., Hawkes D. L., Hussy I. Sustainable fermentative biohydrogen: challenges for process optimization. *Int J Hydrogen Energy* 2002; 27: 1339–1347.
- Hermansson M. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 1999; 14: 105–119.
- Hirsch R. Microcolony formation and consortia. In *Microbial Adhesion and Aggregation*, ed. Marshall, K.C. Berlin: Springer-Verlag 1984; 373–393.
- Hu B., Chen S. L. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *Int J Hydrogen Energy* 2007; 32: 3266-73.
- Hulshoff Pol L. The phenomenon of granulation of anaerobic sludge. 1989.
- Hulshoff Pol L. W., de Castro L. S. I., Lettinga G., Lens P. N. L. Anaerobic sludge granulation. *Water Res* 2004; 38: 1376–1389.
- Hulshoff Pol L. W., Lettinga G., Velzeboer C. T. M., De Zeeuw W. J. Granulation in UASB reactors. *Wat Sci Technol* 1983; 15: 291–304.

- Ilyin V. K., Korniuschenkova I. N., Starkova L. V., Lauriniavichius K. S. Study of methanogenesis during bioutilization of plant residuals. *Acta Astronautica* 2005; 56: 465–470.
- Jo J. H., Jeon C.O., Lee D.S., Park J.M. Process stability and microbial community structure in anaerobic hydrogen-producing microflora from food waste containing kimchi. *J Biotechnol* 2007; 131: 300–308.
- Jung, K.W., Kim, D.H., Shin, H.S. A simple method to reduce the start-up period in a H<sub>2</sub>-producing UASB reactor. *Int. J. Hydrogen Energy* 2011; 36: 1466–1473.
- Kosaric N., Blaszczyk R., Orphan L., Valladares J. The characteristics of granules from upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Wat. Res.* 1990; 24: 1473-1477.
- Kraemer J. T., Bagley D. M. Improving the yield from fermentative hydrogen production. *Biotechnol Lett* 2007; 29: 685-695.
- Lee H. S., Salerno M., Rittmann B. E. Thermodynamic evaluation on H<sub>2</sub> production in glucose fermentation. *Environ Sci Technol* 2008; 42: 2401–2407
- Levin D. B., Pitt L., Love M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int. J. Hydrogen Energy* 2004; 29: 173–185.
- Li R. U., Fang H. Heterotrophic photo fermentative hydrogen production *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol* 2009; 39: 1081–1108
- Li X. Y., Yuan Y. Settling velocities and permeabilities of microbial aggregates. *Water Res* 2002; 36: 3110–3120.
- Liang D. W., Shayegan S. S., Ng, W.J., He, J. Development and characteristics of rapidly formed hydrogen-producing granules in an acidic anaerobic sequencing batch reactor (AnSBR). *Biochem Eng J* 2010; 49: 119–125.
- Liu H., Fang H. H. P. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology* 2002; 95: 249-256.
- Liu X. W., Sheng G. P., Yu H. Q. Physicochemical characteristics of microbial granules. *Biotechnol Adv* 2009; 27: 1061–1070.
- Liu Y. H., He Y. L., Yang S. C., Chun J. A. Studies on the expansion characteristics of the granular bed present in EGSB bioreactors. *Water SA* 2006; 32: 555–560

- Liu Y., Whitman W. B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1125: 171–189.
- Madigan M.T., Martinko J. M., Parker J. Brock biology of microorganisms. 2000, Upper Saddle River, N.J. 9° ed. Prentice Hall.
- Maier, R. P. Environmental Microbiology. 2009, California, USA. ELSEVIER.
- Manzini F., Islas J., Martinez M. Reduction of greenhouse gases using renewable energies in México 2025. *Int J Hydrogen Energy* 2001; 26:145–9.
- Marin P., Alkalay D., Guerrero L., Chamy R., Schiappacasse M. C. Design and startup of anaerobic fluidized bed reactor. *Water Sci Technol* 1999; 40: 63-70.
- Mu Y., Yu H. Q. Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. I: Physicochemical characteristics of hydrogen-producing granules. *Biotechnol Bioeng* 2006; 94: 980-987.
- Mu Y., Yu H. Q. Rheological and fractal characteristics of granular sludge in an upflow anaerobic reactor. *Water Res.* 2006b; 40: 3596–3602.
- Noyola A., Mereno G. Granulation production from raw waste activated sludge. *Water Sci Technol* 1994; 30: 339–346.
- Pereboom J. H. F. Strength characterisation of microbial granules. *Water Sci Technol* 1997; 36: 141–148.
- Perna, V. Producción de biohidrógeno a partir de suero lácteo utilizando un reactor UASB y un reactor de lecho fijo. 2011, Montevideo.
- Reith, J. W. Bio-methane & Bio-hydrogen status and perspectives of biological methane and hydrogen production. Dutch Biological Hydrogen foundation, 2003.
- Rosen M. A., Dincer I. Role of exergy in increasing efficiency and sustainability and reducing environmental impact. *Energ Policy* 2008; 36: 128-37.
- Ross, W. R. The phenomenon of sludge pelletisation in the anaerobic treatment of maize processing waste. *Water SA* 1984;10: 197-204.
- Schmidt J. E., Ahring B. K. Granular sludge formation in upflow anaerobic sledge blanket (UASB) reactors. *Biotechnol Bioeng* 1996; 49(3): 229–246.



- Seghezzi L., Zeeman G., Van Lier J. B., Hamelers H. V. M., Lettinga G., A review: the anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors, *Bioresour Technol* 1998; 65: 175–190.
- Tay J. H., Liu Q. S., Liu Y. Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001b; 91: 168-175.
- Tay J. H., Liu Q. S., Liu Y. The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001; 57: 227-233.
- Thiele J. H., Zeikus J. G. Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: the role of formate versus hydrogen transfer during syntrophic methanogenesis inflocs. *Applied and Environmental Microbiology* 1988; 54: 20–29.
- Valenzuela Z. M. Tecnología solar-eólica-hidrógeno-pilas de combustibles como fuentes de energía. 2009, México: Tecnológico de Estudios Superiores Ecatepec.
- Van Loosdrecht, M. C. M., Zehnder, A. J. B. Energetics of bacterial adhesion. *Experientia* 1990; 46: 817-822.
- VanGinkel S., Sung S. W., Lay J. J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environ Sci Technol* 2001; 35: 4726–4730.
- Veziroglu T. N., Sumer S. 21st century's energy: hydrogen energy system. *Energy Convers Manag* 2008; 49: 1820-31.
- Vieira M. J., Melo L. F., Phinheiro M. M. Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling* 1993; 7: 67–80.
- Wingender J., Flemming H. C. Autoaggregation in flocs and biofilms. In *biotechnology* (ed. J. Winter), Verlag Chemie, Germany 1999; 8: 63-86.
- Wu K. J., Chang C. F., Chang J. S., Simultaneous production of biohydrogen and bioethanol with fluidized-bed and packed-bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge. *Process Biochem* 2007; 42: 1165–1171.
- Yu H. Q., Mu Y. Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. II. Reactor performance in 3-year operation. *Biotechnol Bioeng* 2006; 94(5): 988–995.
- Yu H. Q., Tay J. H., Fang H. H. P., The roles of calcium in sludge granulation during UASB reactor start-up. *Water Res* 2001; 35: 1052–1060.

- Zhang J. J., Li X. Y., Oh S. E., Logan B. E. Physical and hydrodynamic properties of flocs produced during biological hydrogen production. *Biotechnol Bioeng* 2004; 88: 854–860.
- Zhang Z. P., Adav S. S., Show K. Y., Tay J. H., Liang D. T. , Lee D. J., Su A. Characteristics of rapidly formed hydrogen-producing granules and biofilms. *Biotechnol Bioeng* 2008; 101: 926-936.
- Zhang Z. P., Show K. Y., Tay J. H., Liang D. T., Lee D. J., Jiang W. J. Rapid formation of hydrogen-producing granules in an anaerobic continuous stirred tank reactor induced by acid incubation. *Biotechnol Bioeng* 2007; 96: 1040–1050.
- Zhang Z. P., Show K. Y., Tay J. H., Liang D. T., Lee D. J., Su A. The role of acid incubation in rapid immobilization of hydrogen-producing culture in anaerobic upflow column reactors. *Int. J. Hydrogen Energy* 2008; 33: 5151–5160.
- Zhang Z. P., Show K. Y., Tay J. H., Liang D.T., Lee D.J., Jiang W.J. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochem* 2006; 41: 2118–2123
- Zheng X. J., Yu Q., inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. *J. Environ Manage* 2005; 74: 65-70.
- Zinder S. H., Anguish T., Cardwell S. C. Selective inhibition by 2-bromoethanesulfonate of methanogenesis from acetate in a thermophilic anaerobic digester. *Appl Environ Microbiol* 1984; 47; 1343–1345.